

Aus dem
Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
Gatersleben

**"Genetische und physische Feinkartierung im Bereich des *gai*
Verzweigungsgens auf dem Chromosom 2HS der Gerste
(*Hordeum vulgare* L.)"**

Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

als

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von:

Diplomagraringenieur
Sven Gottwald

geboren am 29. Dezember 1968
in Wesel, Bundesrepublik Deutschland

Gutachter: Prof. Dr. A. Graner
Prof. Dr. W.E. Weber
PD. Dr. K. Pillen

Verteidigung am : 02. Februar 2004

Gatersleben 2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006667

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006667>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Das Pflanzenhormon Gibberellinsäure	3
2.1.1	GA-Sensitivität und GA-Insensitivität: zwei Klassen der gestörten GA-Kontrolle	5
2.1.2	Molekulargenetische Analyse der GA-Signaltransduktion	6
2.1.3	Verwendung von Zwergmutanten in der landwirtschaftlichen Züchtung	19
2.2	Kartengestützte Genisolierung	22
2.3	Vergleichende Genomanalyse: Gräser als genetisches System	29
2.3.1	Sequenzorganisation und -konservierung	29
2.3.2	Mechanismen der Genomevolution	33
2.3.3	Die Reispflanze als Gräsermodell	36
2.3.4	Vergleichende RFLP-Kartierung und Genisolierung	42
3	MATERIAL UND METHODEN	46
3.1	Pflanzenmaterial	46
3.1.1	Aufbau der Population	46
3.1.2	GA ₃ Sämlingstest	48
3.2	Molekulare Marker	49
3.2.1	Herkunft der RFLP-Sonden	49
3.2.2	Herkunft der PCR-Primer	50
3.3	DNA-Längenstandards, Enzyme und Basislösungen	50
3.4	Molekulargenetische Analysen	50
3.4.1	RFLP-Analyse	50
3.4.1.1	Isolierung genomischer DNA	50
3.4.1.2	Restriktionsverdau, Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Transfer.....	51
3.4.1.3	Plasmidisolierung aus Bakterien	52
3.4.1.4	Sondenpräparation und radioaktive Markierung	53
3.4.1.5	DNA-Hybridisierung homologer und heterologer DNA-Sonden	54
3.4.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	56
3.4.3	SNP- und Sequenzanalyse	56
3.5	Datenanalyse	59

3.5.1	Bulked Segregant Analysis	59
3.5.2	Kopplungsdatenanalyse	60
3.5.3	Strategie der Markerselektion für die vergleichende Kartierung	62
3.5.4	Sequenzanalysen	65
3.5.4.1	Screening von Nucleotid- und Proteinsequenzdatenbanken	65
3.5.4.2	Instrumente der Proteinsequenzanalyse	66
4	ERGEBNISSE	68
4.1.	Aufbau der genetisch hochauflösenden F₂'-Population	68
4.1.1	Identifikation heterozygoter Ausgangspflanzen	68
1.2	Erstellung einer Ausgangskarte der <i>gai</i> Region mit 200 Individuen	69
4.2	Markerabsättigung der <i>gai</i> Region mit Hilfe von Reis-EST-Sonden	69
4.2.1	Identifikation einer syntänen Region im Reisgenom	69
4.2.2	Kartierung der ermittelten EST-Marker aus der syntänen Reisregion	73
4.2.3	Chromosomale Zuordnung der monomorphen Gersten-EST-Sonden	77
4.2.4	Translokations-Kartierung der <i>gai</i> Region in der Gerste	78
4.3	Hochauflösende RFLP-Kartierung der <i>gai</i> Region	79
4.3.1	Strategie für die hochauflösende Kartierung der <i>gai</i> Region	81
4.3.2	Genetisch hochauflösende Karte der <i>gai</i> Region	82
4.4	Physische Kartierung der <i>gai</i> Region im Reis	84
4.4.1	Identifikation des orthologen YAC-Contigs	86
4.4.2	Identifikation und Analyse des orthologen BAC-Contigs	87
4.4.2.1	Genetisch-physische Beziehungen zwischen Gerste und Reis	88
4.5	Computergestützte Analyse der BAC- / PAC-Sequenzen	90
4.5.1	Genomorganisation in der Reis-Zielregion	91
4.5.2	Analyse möglicher <i>gai</i> Kandidatengene im Reis	93
5	DISKUSSION	98
5.1	Molekulargenetische Analyse des <i>gai</i> Verzweigungslocus	98
5.1.1	Strategie der Markerabsättigung	98
5.1.2	Vergleichende Karte der <i>gai</i> Region	100
5.1.3	Der Einsatz von EST-Sonden in der vergleichenden Kartierung der <i>gai</i> Region ..	104
5.2	Ausblick für eine kartengestützte Klonierung des <i>gai</i> Verzweigungsgens ...	106
5.2.1	GA-insensitive Gene: Fortschritte in Richtung elektronische Identifizierung	108

5.2.2	Kartengestützte Isolierung des <i>gai</i> Gens	115
5.2.2.1	Verhältnis genetischer zu physischer Distanzen in der <i>gai</i> Region	115
5.2.2.2	Strategie für eine physische Kartierung des <i>gai</i> Gens in der Gerste	117
5.2.2.3	Züchterische Nutzung	121
6	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	SUMMARY	125
7	LITERATURVERZEICHNIS	127
8	ANHANG.....	152

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Klonierte und / oder charakterisierte Gene der GA-Signaltransduktion	9
Tabelle 2:	Charakteristika genomischer Reisbanken	40
Tabelle 3:	Sequenzdatenbanken (IRGSP) und Bioinformatik-Dienstleistungen für das Reisgenom	41
Tabelle 4:	Weizen-Gersten-Additionslinien	47
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Reaktionsansätze (20 µl) für die PCR	56
Tabelle 6:	Amplifikationsbedingungen für die PCR-Reaktionen	57
Tabelle 7:	PCR-Reaktionsansatz (10 µl) und Amplifikationsbedingungen für die Sequenzierreaktionen	59
Tabelle 8:	Genetisch und physisch lokalisierte Reis-ESTs des RGP (2001)	64
Tabelle 9:	Verfügbare Gersten-ESTs der B-EST-Datenbank (Vers 2.1)	65
Tabelle 10:	Reis-ESTs und homologe Gersten-ESTs aus der Zielregion auf dem Reischromosom 7L	74
Tabelle 11:	Weizen- und Gersten-ESTs (db-ESTs) mit Homologie zu Reis-ESTs aus der syntänen Region auf Reischromosom 7L	75
Tabelle 12:	Rekombinationsfrequenzen im hochauflösenden MWG2287–cMWG658 Intervall (944 Individuen) mit den unterhalb der Diagonale dargestellten zugehörigen LOD-Werten	82
Tabelle 13:	Spaltungsdaten aller Loci in der hochauflösenden Karte (944 Individuen) mit den entsprechenden χ^2 -Werten	84
Tabelle 14:	Rekombinationsfrequenzen in der hochauflösenden Karte (944 Individuen) mit den unterhalb der Diagonale dargestellten zugehörigen LOD-Werten	85
Tabelle 15:	Ressourcen der genetisch integrierten physischen Karten für das Reischromosom 7 (03 / 2002)	85
Tabelle 16:	Charakterisierung von drei putativen ORFs der GA-Signaltransduktion (SORF I - III) aus der physischen Zielregion im Reis (02 / 2003)	94
Tabelle 17:	Identifizierte Gersten-ESTs mit Homologien zu Genen der GA-Signaltransduktion aus der Gaterslebener B-EST-Datenbank (Vers 2.1) ...	111
Tabelle A1:	Chemikalien	154
Tabelle A2:	Eingesetzte Enzyme	155
Tabelle A3:	Verwendete Kits	155
Tabelle A4:	Liste der eingesetzten Primer für die STS- und SNP-Analysen	155
Tabelle A5:	Allel spezifische Primer für die Reissequenz von SORF II	156
Tabelle A6:	Übersicht über die eingesetzten RFLP- und EST-Sonden	157
Tabelle A7:	Elektronisch zugeordnete EST-Sonden aus der Reis-BAC-Zielregion	159
Tabelle A8:	Ergebnis der RFLP-Analyse aus dem Vorversuch mit 40 F ₃ Pflanzen	160
Tabelle A9:	Rekombinante F ₂ ' Genotypen für den Aufbau der hochauflösenden Karte	161
Tabelle A10:	In ausgewählten Gersten-ESTs und der Gersten-STS-Sonde MWG2287 identifizierte SNPs	162

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Model der aktuell postulierten GA-Signaltransduktion in der Aleuronschicht der Gerste, welche u.a. die Expression von α -Amylasegenen reguliert	15
Abbildung 2:	Elternphänotypen der Kartierungspopulation	46
Abbildung 3:	F ₃ 'Sämlinge der Kartierungspopulation nach 2 Wochen GA ₃ Applikation	48
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Bulk Segregant Analysis (nach GIOVANNONI et al. 1991)	59
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der um den Syntänieansatz und das computergestützte Markerscreening erweiterten 'Gene Golfing' Strategie nach ZHANG und WING (1997)	63
Abbildung 6:	Ausgangskarte der <i>gai</i> Region auf dem Gerstenchromosom 2H, basierend auf der Analyse von 200 F ₂ ' Individuen	69
Abbildung 7:	Generelle Zuordnung des Gerstenchromosoms 2H ('Igri' x 'Franka', GRANER et al. 1993) zu konservierten Segmenten der homologen Reischromosomen 4 und 7	72
Abbildung 8:	Vergleichende Gersten- und Reiskarte in der <i>gai</i> Region, basierend auf 200 F ₂ ' Individuen der 'Hv287' x 'Monte Christo' Gerstenpopulation und 186 F ₂ Pflanzen der RGP 'Nipponbare' x 'Kasalath' Reispopulation	76
Abbildung 9:	Physische Lokalisation des <i>gai</i> Locus auf 2HS	80
Abbildung 10A-D:	Intergenomische Kartierung der <i>gai</i> Region in Gerste und Reis	89
Abbildung 11:	Darstellung des <i>gai</i> orthologen Reis-BAC-Contigs (RiceGAAS-Daten)	92
Abbildung 12 A,B:	Proteinsequenzvergleich und phylogenetische Analyse zwischen zwei putativen GA-insensitiven Reis ORFs (SORF I und II) aus der syntänen Reisgenomregion und sechs funktionell charakterisierten Signaltransduktionsgenen der GRAS-Familie	96
Abbildung A1:	Proteinsequenzvergleich in vier konservierten und charakteristischen GRAS Sequenzregionen	163

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abscisic-acid (Abscisinsäure)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaar
bist.	bisteril
BSA	Bulked Segregant Analysis
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calicum
ca.	zirka
cDNA	copy DNA
cM	centiMorgan
cpm	counts per minute
CTP	Cytosintriphosphat
DHs	Doppelhaploide-Population
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
ed	Editor
EGRAM	European Gramineae Mapping Program
EST	Expressed Sequence Tag
et al.	et alteri
F ₂	zweite Filialgeneration
g	Gramm
GA	Gibberellic-acid (Gibberellinsäure)
gDNA	genomische DNA
h	Hour (Stunde)
ha	Hektar
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IRGSP	International Rice Genome Sequencing Project (Internationales Reis Genom-Sequenz Projekt)
i.d.R.	in der Regel

kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LRR	Leucine-rich repeat
M	molar
MAFF	Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
Mb	Megabasenpaare
Mio.	Millionen
mRNA	Messenger RNA
ng	Nanogramm
PAC	P1 Artificial Chromosome
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pers. Mittl.	persönliche Mitteilung
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
QTL	Quantitative Trait Locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase	Ribonuclease
RGP	Rice Genome Research Program (Reis-Genom-Programm), Tsukuba, Japan
sec	Second (Sekunde)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STS	Sequence Tagged Site
TB	Translokationsbruchpunkt
U	Unit
u.a.	unter anderem
U / min	Umdrehungen pro Minute
u. U.	unter Umständen
Vol.	Volumen
WWW	World Wide Web
w / v	Gewicht / Volumen
YAC	Yeast Artificial Chromosome
μ	10 ⁻⁶
μg	Mikrogramm
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist eine der ältesten Kulturpflanzen. Erste Funde aus dem Nahen Osten weisen auf eine Kultivierung der Gerste seit 7000 v. Chr. hin (GRANER und ALTSCHMIED 2001). Aus Wildgersten mit brüchiger Ährenspindel und kleinen Körnern sind durch Auslese spindelfester Mutanten die Kulturformen entstanden. Als Ursprungspflanze wird die zweizeilige Wildgerste (*Hordeum vulgare* spp. *spontaneum* L.) angesehen (SALAMINI et al. 2002). Heute wird die Gerste in Deutschland auf einer Fläche von 2,0 Mio. ha angebaut, und stellt damit nach dem Weizen die zweitwichtigste Kulturpflanze dar. Der durchschnittliche Flächenertrag wurde seit 1961 von 23,6 dt / ha auf 55,5 dt / ha gesteigert (FAO 2002). Neben ihrer großen Bedeutung für die Landwirtschaft, eignet sich die Gerste auf Grund ihrer autogamen Fortpflanzung und der diploiden Genomstruktur ($2n = 2x = 14$) hervorragend für genetische und cytologische Untersuchungen.

Die Wachstumsregulation der höheren Pflanzen erfolgt durch die Phytohormone. Eine der wichtigsten Familien unter diesen Hormonen sind die Gibberelline, die aktuell mehr als 110 Substanzen umfassen. Wie alle Phytohormone sind auch Gibberelline interzelluläre Botenstoffe, die über spezifische Rezeptoren an den Zelloberflächen einen Informationsfluß im Zellinneren auslösen und auf diese Weise die Expression entwicklungsrelevanter Zielgene kontrollieren. Diese intrazelluläre Kommunikation erfolgt über Signalketten (Signaltransduktion), die im wesentlichen aus einer Kaskade von negativen bzw. positiven Regulatorkomponenten bestehen. Defekte Regulatorgene haben in der Regel eine Unterbrechung dieses Informationsflusses zur Folge, mit entsprechenden Konsequenzen für die Pflanzenentwicklung. Ein häufiger Effekt ist die Verzweigung der betroffenen Pflanze. Da in diesem Falle nicht die Gibberellin-Biosynthese, sondern die Hormonwahrnehmung gestört ist, zeigen diese Zwergmutanten auch nach einer exogenen Gibberellin-Applikation kein restauratives Halmwachstum. Man spricht deshalb von Gibberellin-insensitiven Mutanten.

Typische Vertreter dieser Mutanten, die *Rht* (*reduced height*)-Pflanzen des Weizens, konnten u.a. auf Grund ihrer positiven pleiotropen Effekte auf das Ertragspotential zu wesentlichen Trägern der sogenannten „Grünen Revolution“ in den Jahren zwischen 1960 und 1970 werden.

Zu dieser Klasse gehört auch die Zwergmutante 'Hv287', die Trägerin des defekten *gai* Gibberellin-Signaltransduktionsgens ist. Aus Untersuchungen von FAVRET et al. (1975), HOPP et al. (1981) und BÖRNER und KORZUN (1995) waren der GA-insensitive, monogene und rezessive Charakter der *gai* Mutation, sowie die genetische Position des Gens in der proximalen Region des Gerstenchromosoms 2HS bereits bekannt. Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden im Aufbau einer hochauflösenden Kopplungskarte und der Markerabsättigung der *gai* Region, als Ausgangsposition für die kartengestützte Genisolierung und die funktionale Analyse des Gens. Basierend auf den aktuellen Erkenntnissen über ausgeprägte syntäne Beziehungen zwischen dem Gersten- und Reisgenom und den verfügbaren genomischen Ressourcen der als Gräsermodell etablierten Reispflanze (*Oryza sativa* L.), wurde eine auf der vergleichenden Kartierung basierende Strategie eingesetzt, die aus vier aufeinander aufbauenden Arbeitsschritten bestand:

- Identifikation und Bestätigung der syntänen Region im Reis
- Aufbau einer hochauflösenden Gerstenkarte
- Physische Kartierung im Reisgenom: Identifikation und Bestätigung eines YAC- bzw. BAC- / PAC-Contigs als zusätzliche Markerquelle
- Analyse der Reissequenzstrukturdaten hinsichtlich möglicher Kandidatengene

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das Pflanzenhormon Gibberellinsäure

Der Ausgangspunkt für die Entdeckung der Gibberellinsäure war eine Reiskrankheit, die sich in einem hohen Wuchs und einem fehlenden Fruchtansatz äußerte. In Japan nannte man diese Krankheit „verrückter Reis“ oder *bakanae* (LANGE 1998). Physiologen fanden heraus, daß der Größenwuchs dieser Pflanzen auf die Absonderung eines Pilzes zurückzuführen war. Im Jahr 1930 gelang es japanischen Wissenschaftlern diese Substanz aus Filtraten der Pilzkultur zu isolieren und man benannte sie nach dem Pilz - *Gibberella fujikuroi* – Gibberellin. Bedingt durch den 2. Weltkrieg wurden Gibberellinsäuren (GAs) in Großbritannien und den USA 1950 ein zweites und drittes Mal entdeckt. Auch diesmal wurde die Substanz jeweils aus den Pilzkulturen isoliert und entsprechend benannt. Die Entdeckung von drei unterschiedlichen GAs, die als A₁, A₂ und A₃ klassifiziert wurden, ließ auf eine ganze Familie schließen, deren Mitglieder sich durch den charakteristischen *ent*-Kauren Ring auszeichnen. Sobald GAs verfügbar waren, wurden ihre Wirkungen an zahlreichen Pflanzen untersucht. Unter anderem beobachtete man bei zwergwüchsigen Erbsen- und Maispflanzen spektakuläre Wachstumsraten, wogegen Pflanzen die eine genetische Anlage zum Höhenwachstum besaßen überhaupt nicht auf exogen applizierte GAs reagierten (Übersicht: HEDDEN und PHILLIPS 2000). Da man mit GAs die Wuchshöhe von Zwergpflanzen steigern konnte, fragte man sich natürlich, ob Pflanzen auch eigene GAs enthielten. Im Jahr 1958 gelang es Jake MacMillian erstmals eine als GA₁ identifizierte Substanz aus den Samen der Feuerbohne (*Phaseolus coccineus*) zu isolieren (PHINNEY 1956). Die, in den folgenden Jahren entdeckten GAs wurden nach der Reihenfolge ihrer Isolierung numeriert (GA₁ – GA_x). Biochemische und physiologische Analysen haben gezeigt, daß von den 110 pflanzlichen GAs nur wenige als Hormone fungieren, alle übrigen stellen intermediäre oder inaktive Formen dar (GRAEBE 1987). Die bioaktiven GAs (u.a. GA₁, GA₃, GA₄ und GA₇) spielen als

Hormone entweder eine generelle oder eine spezifische Rolle in der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse, wie Samenkeimung, Mobilisierung von Reservestoffen aus dem Endosperm, Sproßwachstum, Blütenbildung und –entwicklung sowie Fruchtbildung (HOOLEY 1994; DAVIES 1995). In diesem Zusammenhang werden besonders das Sproßwachstum (XU et al. 1997; MATSUKURA et al. 1998; WEBB et al. 1998) und die Mobilisierung von Reservestoffen aus dem Endosperm physiologisch und molekulargenetisch untersucht (ROGERS et al. 1994; ZWAR und CHANDLER 1995; ROGERS und ROGERS 1999). Dabei zeigte sich speziell für das Sproßwachstum, daß durch die Gibberellinwirkung vornehmlich das Streckungs- und nicht das Teilungswachstum der beteiligten Zellen gefördert wird.

Neben der GA liegen in Pflanzen noch vier weitere Wachstumshormone vor. Auxine, von denen die Indol-3-Essigsäure (IAA) die wichtigste Substanz ist, wurden als erste Phytohormone entdeckt, und sie übernehmen vor allem in der Steuerung des Sproßwachstums, der Apikaldominanz, der Wurzelbildung und der Fruchtreife eine zentrale Funktion. Cytokinine sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt, dazu gehört vor allem die Kontrolle der Zellteilung und –differenzierung während des Pflanzenwachstums. Von den Effekten des Ethylens auf die Pflanzenentwicklung glaubte man lange sie seinen von Auxinen verursacht. Heute weiß man, daß Ethylene vor allem als Reaktion auf Umweltstreß sowie auf physische und chemische Verletzungen synthetisiert werden. Daneben spielen sie eine Rolle in der Fruchtreife, der Blüten- und Wurzelentwicklung. Das vierte Phytohormon, die Abscisinsäure (ABA), ist ein negativer Regulator des Pflanzenwachstums. Wesentliche Funktionen sind die Steuerung der Spaltöffnungsbewegung bei Umweltstreß und die Hemmung der Samenreifung (KENDE und ZEEVAART 1997).

Gestalt und Funktion eines vielzelligen Organismus beruhen maßgeblich auf der effizienten Kommunikation zwischen den zahllosen, ihn aufbauenden Zellen. Pflanzen, die nicht über Mobilität verfügen, entwickelten nie ein mit den tierischen Organismen vergleichbares

Nervensystem. Deshalb übernehmen Hormone als chemische Botenstoffe nicht nur die Regulation der natürlichen, sondern auch der Umwelt bedingten Pflanzenentwicklung. Nur auf diese Weise kann die Pflanze auf innere und äußere Veränderungen reagieren, wie z. B. Verletzungen, Pathogenbefall, Nährstoffbedarf oder Lichtmenge und -qualität. (Übersicht: CHORY und WU 2001). Es verwundert von daher nicht, daß Hormone über ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionen miteinander interagieren, entweder fördernd, wie bei der Auxin induzierten Synthese der Ethylene oder antagonistisch, wie bei der Hemmung von GA-induzierten Enzymen durch ABA im Samen (KENDE und ZEEVAART 1997; LOVEGROVE und HOOLEY 2000).

2.1.1 GA-Sensitivität und GA-Insensitivität: zwei Klassen der gestörten GA-Kontrolle

Grundsätzlich muß im Falle einer GA bedingten Störung des Größenwachstums von Pflanzen zwischen zwei Klassen von Mutanten unterschieden werden. Auf der einen Seite die Klasse der GA-Biosynthesemutanten bzw. GA-Mangelmutanten, deren charakteristischer Zwergphänotyp durch eine defekte Biosynthese und dem daraus resultierenden Mangel an bioaktiven GAs verursacht wird. Die GA-Biosynthese ist stark differenziert und läuft in drei Stufen jeweils in einem anderen Kompartiment der Pflanze ab (KENDE und ZEEVAART 1997, LANGE 1998). Dabei werden zahlreiche Zwischenprodukte gebildet, die ausgehend vom meristematischen Sproßgewebe über das Phloem in andere Gewebe transportiert und in ihren jeweiligen Wirkungsstätten zu bioaktiven GAs umgebaut werden. Auf Grund dieser starken Differenzierung sind zahlreiche GA-Mangelmutanten bekannt, die geholfen haben die komplexe Biosynthese zu verstehen und die beteiligten Gene zu identifizieren (HEDDEN und PHILLIPS 2000; YAMAGUCHI und KAMIYA 2000). Appliziert man solchen Zwergmutanten aktive GAs, so reagieren sie 'GA-sensitiv' und stellen den ursprünglichen Phänotyp vollständig oder größtenteils wieder her.

Dagegen sind Mutanten, die nicht auf die exogene Applikation von GAs reagieren der zweiten Klasse – den Signaltransduktionsmutanten - zu zuordnen. Die beobachtete GA-Insensitivität beruht bei diesen Mutanten auf einem Defekt in der Signaltransduktion, d.h. in jenem Kommunikationsweg über den die GA bestimmte Entwicklungsprozesse reguliert. Dies führt dazu, daß die Pflanzenentwicklung vollständig, oder teilweise von der direkten GA-Kontrolle abkoppelt wird.

Die Klasse der Signaltransduktionsmutanten teilt sich wiederum in zwei phänotypisch unterschiedliche Gruppen auf. Einmal die Gruppe der Zwergmutanten, die äußerlich den GA-sensitiven Mutanten gleichen, aber den GA-Mangel eigentlich nur simulieren. Diese Pflanzen weisen i. d. R. eine erhöhte endogene Konzentrationen an aktiven GAs auf, womit ihre GA-insensitive Reaktion erklärt werden kann (FUJIOKA et al. 1988; LENTON et al. 1987; TALÒN et al. 1990a; PENG and HARBERD 1993; XU et al. 1995; COWLING et al. 1998; AMADOR et al. 2001). Da Zwergmutanten mit einer gestörten Signaltransduktion phänotypisch den verzweigten GA-Biosynthesemutanten gleichen, ist eine zuverlässige Unterscheidung der beiden Mutantenklassen nur mittels der exogenen Applikation von aktiven GAs möglich (SUN 2000).

Die zweite Gruppe der Signaltransduktionsmutanten bildet einen völlig gegensätzlichen Phänotypen aus, der sich in einem gesteigerten Höhenwachstum äußert. Bei diesen "schlanken" Mutanten führt die gestörte GA-Kontrolle nicht zu einem blockierten Wachstum, sondern zu einem konstitutiven, ungebremsten Höhenwachstum. Die gegensätzlichen phänotypischen Effekte der gestörten Signaltransduktion beruhen auf zwei unterschiedlichen Mutationstypen in den betroffenen Genen, die im weiteren noch näher erläutert werden.

2.1.2 Molekulargenetische Analyse der GA-Signaltransduktion

Die Koordination der Entwicklung und der umweltabhängigen Reaktion von komplexen, vielzelligen Organismen erfordert eine Reihe von Signalmechanismen, über

welche die entsprechenden Informationen transportiert werden. Man spricht in diesem Zusammenhang deshalb auch von Mechanismen des molekularen Erkennens, Erinnerens und Vergessens. Während die Erforschung des Stoffwechselnetzwerks allein mit biochemischen Methoden weitgehend aufgeklärt werden konnte, erhielt die Erforschung regulatorischer Gene und Proteine, die nicht an der Katalyse chemischer Reaktionen beteiligt sind, erst mit der Verfügbarkeit molekulargenetischer Methoden einen deutlichen Aufschwung. Die wesentlichen Mechanismen sind allen Signaltransduktionen gemeinsam. Der Botenstoff, z. B. das Hormon GA, wird durch die interzellulären Zwischenräume transportiert und binden an einen Rezeptor an der Zelloberfläche, der mit einem signaltransduzierenden Proteinkomplex in der Zellmembran wechselwirkt. Dieser transportiert das Signal durch die Zellwand und leitet es an ein Effektorenzym an der Zellinnenseite weiter, das die Synthese intrazellulärer, sekundärer Botenstoffe reguliert. Auf diese Weise gelangt das Signal an eine Kette von hintereinander geschalteten negativen und positiven Regulatorkomponenten, die gezielt zelluläre Prozesse induzieren (CHORY und WU 2001). Eine wesentliche Eigenschaft hormoneller Signalmechanismen ist die Rückkopplungskontrolle über die sich Biosynthese und Genexpression wechselseitig regulieren. Die Konzentration eines bestimmten Proteins der Signalkette wirkt dabei als direkter Repressor der hormonellen Synthese (OLSZEWSKI et al. 2002).

Das Bild, das man heute von der GA-Signaltransduktion hat, entspricht einem 'GA de-repressiven Repressor Modell'. Dabei deaktiviert das GA-Signal eine ganze Reihe von negativen Regulatoren bzw. Repressorkomponenten und schaltet auf diese Weise die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren frei (RICHARDS et al. 2001). Ein Mechanismus, wie er bereits für die Signalkette des Pflanzenhormons Ethylen, von HARBERD et al. (1998) beschrieben wurde. Grundlegend für die Entwicklung dieser Hypothese waren die Identifikation und die anschließende molekulargenetische und biochemische Untersuchung von GA-insensitiven Mutanten. Sie ermöglichten die Identifikation jener Gene,

die mögliche Rezeptoren oder Komponenten der Signalkette codieren (Tab. 1) (HOOLEY 1994). Mutanten mit defekter GA-Signaltransduktion wurden in diversen monocotylen und dicotylen Pflanzenarten entdeckt (SWAIN und OLSZEWSKI 1996). Dabei führten vor allem Analysen von GA-abhängigen Prozessen in der Modellpflanze Arabidopsis und in den Getreidealeuronzellen zur Identifizierung und zum besseren Verständnis wesentlicher Regulator- und Transkriptionsgene (SUN 2000).

Das Gen *GAI* (*GIBBERELIC-ACID INSENSITIVE*, Wildtyp-Allel) der semidominanten Arabidopsis Zwergmutante '*gai*', war die erste zentrale Komponente der GA-Signaltransduktion die kloniert werden konnte. Diese Mutante hatte eine deutliche Insensitivität gegenüber exogen applizierten GAs gezeigt, während gleichzeitig eine erhöhte Konzentration an endogenen GAs gemessen werden konnte (KOORNNEEF et al. 1985; PENG et al. 1997). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß es sich bei dem *GAI* Produkt (*GAI* Protein) um einen negativen Regulator handeln muß, dessen hemmende Aktivität in der defekten Version trotz GA-Signal nicht mehr aufgehoben wird und dessen Mutation somit als eine Funktionszunahme (gain-of-function) beschrieben werden kann (ROSS et al. 1997).

Nur wenig später konnte eine weitere Signalkomponente aus Arabidopsis kloniert werden. Zuvor hatte man in einem Screening verzweigter '*gal-3*' GA-Biosynthesemutanten gezielt nach Pflanzen gesucht, die trotz endogenem GA-Mangel eine normale Wuchshöhe zeigten (SILVERSTONE et al. 1997). Dabei wurde das Gen *RGA* (*REPRESSOR OF GAI*, Wildtyp-Allel) in einer Mutante identifiziert, die auch vor dem genetischen Hintergrund des defekten Biosynthesegens *gal* einen beinahe normalen Wuchstypen entwickelt hatte. Da auch in der '*rga / gal*' Doppelmutante unverändert niedrige endogene GA-Konzentrationen gemessen wurden, mußte für das *RGA* Gen eine Beteiligung an der GA-Biosynthese ausgeschlossen werden. Naheliegender war die Annahme, daß die defekte *rga* Version das Pflanzenwachstum

von der GA-Kontrolle abgekoppelt hat, und daß diese Mutation somit den Funktionsverlust (loss-of-function) eines negativen Regulators verursacht.

Tabelle 1: Klonierte und / oder charakterisierte Gene der GA-Signaltransduktion

Pflanze	Locus	P	V	Proteinfunktion	EMBL-Acc.	Chr.	Ref.
Arabidopsis	<i>GAI</i>	Z	dom	Repressor	Y15193	1	1
	<i>RGL1</i>	Z	dom	Repressor	AY048749	1 ¹⁾	2
	<i>SLY1</i>	Z	rez	Rezeptor oder Aktivator	-	-	3
	<i>SHI</i>	Z	dom	negativer Transkriptionsfaktor	NM_126033	5 ¹⁾	4
	<i>PKL</i>	Z	rez	putativer Aktivator	AF 185577	2	5
	<i>RGA1</i>	H	rez	Repressor	Y11336	2 ¹⁾	6
	<i>SPY</i>	H	rez	Repressor	U62135	3 ¹⁾	7
	<i>GAR2-1</i>	H	dom	Repressor	-	-	8
Gerste	<i>GSE1</i>	Z	rez	Aktivator	-	-	9
	<i>SLNI</i>	H	rez	Repressor	AF460219	-	10
	<i>HRT</i>	H	-	Repressor	AJ001317	-	11
	<i>HvSPY</i>	H	rez	Repressor	AF035820	6H	12
Reis	<i>DI</i>	Z	rez	Gα-Protein	AB028602	5	13
	<i>OsGAI</i>	Z	dom	Repressor	AB030956	3	14
	<i>SLR1</i>	H	rez	Repressor	s. <i>OsGAI</i>	3	15
	<i>OsGRF1</i>	Z	-	Aktivator	AF201895	2 ¹⁾	16
	<i>GID1</i>	Z	-	Aktivator	-	-	17
Weizen	<i>Rht-D1a</i>	Z	dom	Repressor	AJ242531	4D	18
Mais	<i>D8</i>	Z	dom	Repressor	AJ242531	1	19

‘P’: Phänotyp der Mutante; ‘Z’: Zwergwuchs; ‘H’: Hochwuchs; ‘V’: Vererbung; ‘rez’: rezessiv; ‘dom’: dominant; ¹⁾ Computergestützte chromosomale Zuordnung durch den Autor an Hand der jeweiligen Gensequenzen in den Genomsequenzdatenbanken

Referenz (Ref.): ¹ KOORNNEEF et al. 1985 ; ² PENG et al. 1997, ³ SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al. 1998 / WEN und CHANG 2002, ⁴ STEBER et al. 1998, ⁵ FRIDBORG et al. 1999, ⁶ OGAS et al. 1999, ⁷ SILVERSTONE et al. 1997, 1998, ⁸ JACOBSEN et al. 1996, ⁹ WILSON und SOMERVILLE 1995, ¹⁰ CHANDLER und ROBERTSON 1999, ¹¹ CHANDLER et al. 2002, ¹² RAVENTÓS et al. 1998, ¹³ ROBERTSON et al. 1998, ¹⁴ ASHIKARI et al. 1999 / UEGUCHI-TANAKA et al. 2000, ¹⁵ OGAWA et al. 2000, ¹⁶ IKEDA et al. 2001, ¹⁷ VAN DER KNAAP et al. 2000, ¹⁸ UEGUCHI-TANAKA et al. 2001 ¹⁹ PENG et al. 1999, ¹⁹ HARBERD und FREELING 1989

Nach der Klonierung von *RGA* (SILVERSTONE et al. 1998) offenbarten die DNA- und Proteinsequenzen von *GAI* und *RGA* signifikante Homologien. Dies führte zu der Annahme, daß beide Gene teilweise redundante Repressorfunktionen in zwei parallel ablaufenden Signalwegen ausüben. Wobei der Signalweg über *GAI* offensichtlich gegenüber dem *RGA*-

Weg dominant ist und ein weiteres Spektrum kontrollierter Entwicklungsprozesse aufweist (HARBERD et al. 1998; SILVERSTONE et al. 1998). So scheint *RGA*, z. B. nicht an der Regulation der Blütenentwicklung beteiligt zu sein, da auch die '*rga / gal-3*' Doppelmutante, wie die '*gal-3*' Einzelmutante steril bleibt. Den endgültigen Beweis für die negative Regulatorfunktion beider Gene lieferte die '*rga / gai / gal-3*' Dreifachmutante, in der beide Gene ausgeschaltet worden waren. Diese Pflanzen zeigten keine der phänotypischen Anomalien, die normalerweise durch das defekte GA-Biosynthesegen *gal* verursacht werden. Offensichtlich benötigt eine Pflanze, die nicht mehr über die *GAI* und *RGA* Repressoren verfügt kein GA-Signal für Entwicklungsprozesse wie das Höhenwachstum, die Keimung oder die Blütenbildung (Übersicht: RICHARDS et al. 2001). Alle Untersuchungen wiesen daraufhin, daß mit *GAI* und *RGA* zwei wesentliche und zentrale Komponenten der GA-Signaltransduktion kloniert worden waren (HARBERD et al. 1998; SILVERSTONE et al. 1998). In der Zwischenzeit konnten eine ganze Reihe von weiteren Genen aus unterschiedlichen monocotylen und dicotylen Pflanzenarten kloniert werden, die signifikante DNA- und Aminosäuresequenzhomologien zu den *GAI*- und *RGA*-Komponenten zeigten. Mutationen, die somit offensichtlich *GAI* / *RGA* Proteine beeinträchtigen, wurden neben Arabidopsis auch in Getreidepflanzen identifiziert. Dazu gehören Weizen (*reduced height (rht-D1a)*); GALE and MARSHALL 1976; BÖRNER et al. 1996), Mais (*dwarf8 (d8)*); PHINNEY 1956; FUJIOKA et al. 1988), Reis (*Oryza sativa* L. *gibberellin-acid insensitive (Osgai)*); OGAWA et al. 2000) oder *slender rice1 (slr1)*; IKEDA et al. 2001) und Gerste (*slender1 (sln1)*); FOSTER 1977; CHANDLER 2002; GUBLER et al. 2002) (Tab. 1).

Nicht alle der genannten Allele verursachen semidominante Zwergmutationen. Ausnahmen sind die *slr1* und *sln1* Allele aus Reis und Gerste, die sich in einem konstitutiven Höhenwachstum äußern. Bei diesen Genen handelt es sich um rezessive Funktionsverlustmutationen, vergleichbar dem *rga* Gen (SUN 2000). Die übrigen Mutanten zeigen Merkmale wie sie für '*gai*' Mutanten charakteristisch sind: reduzierter Wuchstyp,

dunkelgrüne Färbung der Blätter und verspäteter Blühzeitpunkt unter Kurztagsbedingungen (RICHARDS et al. 2001).

Vergleichsstudien zwischen den Proteinen der Wildtyp-Allele oben genannter Gene wiesen nach, daß sich die gefundenen Sequenzhomologien auf funktionsrelevante Sequenzdomänen und -motive beziehen, welche diese Proteine als Transkriptionsfaktoren charakterisieren (PYSH et al. 1999). Vor allem die N-terminale Region weist konservierte, spezifische Domänen auf und fungiert offensichtlich als Aktivierungsdomäne für Protein-Protein Interaktionen im Verlauf der Signalübertragung (ELLENBERGER et al. 1992; PYSH et al. 1999). Unter diesen konservierten Regionen ist vor allem die DELLA-Domäne hervor zu heben, deren Existenz spezifisch für alle GAI / RGA homologen Proteine ist. Als mögliche GA-Signaldomäne hat sie einen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität der Repressorproteine und damit auf ihre Funktion (PENG et al. 1997; DILL et al. 2001). Bereits der Vergleich der Aminosäuresequenzen von *GAI* und *gai* Produkten hatte offenbart, daß die charakteristische Verzweigung der '*gai*' Mutante durch eine 17-Aminosäuren umfassende Deletion in der DELLA-Domäne verursacht wird (PENG et al. 1997). Entsprechende Untersuchungen der Proteinstrukturen von *Rht-D1a*, *D8* und *OsGAI* lieferten ein vergleichbares Bild (PENG et al. 1999; IKEDA et al. 2001). Offensichtlich führt eine fehlerhafte DELLA-Region zu einer Funktionszunahme des negativen Regulators. Mittlerweile konnte dies über transgene Zwergmutanten, die nach einem gezielten Genaustausch GAI Proteine mit einer defekten DELLA-Domäne exprimiert hatten, bestätigt werden (FU et al. 2001; ITHO et al. 2002). Liegt dagegen der Ort der Mutation außerhalb von DELLA, wie in den Proteinstrukturen der Hochwuchstypen beobachtet, so führt dies zu einem Funktionsverlust des negativen Regulators und dadurch zu einem ungebremsten Wachstum (DILL et al. 2001; FU et al. 2001; CHANDLER et al. 2002). Das beste Beispiel hierfür sind *OsGAI* und *SLRI*, die beide unabhängig voneinander isoliert wurden und deren veränderte Proteine jeweils eine Verzweigung und einen Hochwuchs verursachen. Die Untersuchung der jeweiligen Gen- und

Proteinstrukturen, sowie der genomischen Loci ergab, daß es sich hierbei um die multiple Allelie eines Gens handelt. Entweder wird das Protein in der OsGAI Version mit defekter DELLA-Region exprimiert oder in der SLR1 Version mit einer Mutation außerhalb der DELLA-Region (IKEDA et al. 2001).

Diese Daten führten zu der heute akzeptierten Auffassung, daß es sich bei den GAI / RGA verwandten Genen um Funktionsorthologe handelt, die zwar aus unterschiedlichen Gattungen stammen, deren Funktionen aber während der getrennt verlaufenden Evolution erhalten geblieben sind. Dabei stammen die *GAI* / *RGA* Orthologen offensichtlich von einem gemeinsamen Vorfahren der monocotylen und dicotylen Pflanzen ab und wurden auch nach deren Aufspaltung nahezu unverändert weitervererbt (OGAWA et al. 2000; FRIDBERG 2001). Deutliche Hinweise auf eine orthologe Verwandtschaft sind immer Konservierungen in den jeweiligen Gen- bzw. Proteinstrukturen und der chromosomalen Positionen (KELLER und FEUILLET 2000; ECKARDT 2001). Für die Getreide-Allele konnten entsprechende orthologe Loci zwischen den Gattungen nachgewiesen werden (BÖRNER et al. 1997; PENG et al. 1999; IKEDA et al. 2001). Mittlerweile gehören die *GAI* / *RGA* Orthologen zu einer Superfamilie von pflanzenspezifischen Transkriptionsregulatoren, die nach den ersten drei Mitgliedern - *GAI*, *RGA* und *SCR* - als GRAS-Familie benannt wurde. Die Mitglieder dieser Familie weisen in ihren Genprodukten eine signifikant konservierte C-terminale Region auf, die neben der hoch konservierten und deshalb GRAS spezifischen VHIID-Domäne (PENG et al. 1997; SILVERSTONE et al. 1998; ROSSBERG et al 2001) noch vier weitere charakteristische Proteinmotive aufweist (Abb. A1) (Übersicht: PYSH et al. 1999). Da eine signifikante Konservierung innerhalb der N-terminalen Region und der DELLA-Domäne nur zwischen den GA-regulierten *GAI* / *RGA* orthologen Proteinen vorliegt, gliedert sich die GRAS-Familie dementsprechend in zwei Unterfamilien. Die zweite Unterfamilie umfaßt weitere Transkriptionsregulatoren aus diversen Signalketten. Dazu gehören u.a. die Proteine der Arabidopsis Gene *SCARECROW* (*SCR*, Wildtyp-Allel; SCHERES et al. 1995; DI LAURENZIO et

al. 1996), *SHORT-ROOT* (*SHR*, Wildtyp-Allel; BENFEY et al. 1993; HELARIUTTA et al. 2000) und *PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION 1-1* (*PAT1*, Wildtyp-Allel; BOLLE et al. 2000), sowie das *LATERAL SUPPRESSOR* (*LS*, Wildtyp-Allel; SCHUMACHER et al. 1999) Gen der Tomate.

Abbildung 1 zeigt ein Modell der aktuell postulierten Signaltransduktion in den Aleuronzellen der Gerste, welche u.a. die Expression von α -Amylasegenen reguliert und über den Abbau von Reservestoffen die Samenkeimung einleitet. Da bioaktive GAs offensichtlich über mehrere gewebespezifische Signalketten ihre Wirkung auf bestimmte Entwicklungsvorgänge ausüben, kann das hier erläuterte Modell nur exemplarisch sein. Allerdings zeigt es wesentliche Komponenten, die möglicherweise allen GA-Reaktionen gemeinsam sind (SUN 2000). Zudem kann auf der Grundlage der aktuell verfügbaren Erkenntnisse nur ein hypothetisches Modell der Signaltransduktion gegeben werden. Dabei stellt man sich den Ablauf der GA-Kontrolle folgendermaßen vor:

(1) GA₁ aus dem Embryo, vermutlich im Scutellum synthetisiert, bindet an einen unbekanntem Rezeptor an der Oberfläche der Aleuronzelle. RICHARDS et al. (2001) vermuteten das *SLEEPY1* (*SLY1*, Wildtyp-Allel; STEBER et al. 1998), ein in Arabidopsis identifiziertes Gen für die Rolle als GA-Rezeptor in Frage kommen könnte. Dieses Gen wurde in der GA-insensitiven Zwergmutante '*sly1 abil-1*' identifiziert, die nur vor dem genetischen Hintergrund des ABA-insensitiven Gens *abil-1* keimt. Der rezessive Charakter der *sly1* Mutation weist auf einen Funktionsverlust in einem positiven Regulator oder GA-Rezeptor hin, denn im Unterschied zu den rezessiven Funktionsverlustmutationen der bekannten negativen Regulatoren zeigt *sly1* einen verzweigten Phänotyp. Beantworten läßt sich diese Frage aber erst nach der Klonierung von *SLY1* (BETHKE und JONES 1998; RICHARDS et al. 2001).

(2) Durch die Interaktion des Rezeptors mit einem heterotrimerischen G α (GTP-bindende α -Untereinheit)-Protein werden die beiden Signalketten (Ca²⁺-unabhängig und -abhängig) angeschaltet. Dieser Mechanismus der Signalumwandlung wurde bereits für zahlreiche tierische und mikrobielle Signaltransduktionen nachgewiesen (NEAR 1995; HAMM 1998). In der Gerste ist bisher kein G-Protein codierendes Gen bekannt, allerdings wurde ein entsprechendes Gen, *DWARF1* (*DI*, Wildtyp-Allel; ASHIKARI et al. 1999; FUJISAWA et al. 1999), aus dem Reis kloniert. Eine Beteiligung von *DI* an der GA-Signaltransduktion wurde an Hand der '*di*' Zwergmutante untersucht, die das rezessive Allel *di* trägt und alle typischen Merkmale einer GA-insensitiven Zwergmutante zeigt (MITSUNAGA et al. 1994; UEGUCHI-TANAKA et al. 2000). Auch hier weist die rezessive Verzweigung auf einen positiven Regulator hin. Doppelmutanten mit *di* und *slr1* zeigten einen konstitutiven Höhenwuchs was vermuten läßt, daß der Repressor *SLR1* epistatisch gegenüber *DI* ist. Somit ist *DI* in der Signalkette der Komponente *SLR1* vorgeschaltet (UEGUCHI-TANAKA et al. 2000).

(3) Im Ca²⁺-unabhängigen Weg transportierten sekundäre Botenstoffe (hier nicht gezeigt) das Signal durch das Cytoplasma. Ein mögliches Ziel könnte dabei der vermutlich kerngebundene positive Regulator *GA-Sensitivity1* (*GSE1* Wildtyp-Allel; (CHANDLER and ROBERTSON 1999)

(4) sein. *GSE1* würde dann die Synthese des Transkriptionsfaktors *GAMyb* (7) über die Inaktivierung der Repressoren *HvSPY* (5) und *SLN1* (6) ermöglichen (Abbildung 1 zeigt beide Repressoren im inaktiven Zustand). Identifiziert wurde *GSE1* in der Gerste und ähnlich wie *sly1* und *di* ist *gse1* eine rezessive Mutation, die eine GA-insensitive Halbverzweigung sowie eine unterdrückte α -Amylase Genexpression zur Folge hat (CHANDLER and ROBERTSON 1999). Untersuchungen des mutierten *sln1* Allels vor dem genetischen *gse1* Hintergrund wiesen eine Hypostasie der *GSE1*-Komponente nach, die somit in der Signalkette der *SLN1*-Komponente vorgeschaltet ist (CHANDLER and ROBERTSON 1999; GUBLER et al. 2002). Allerdings konnte bisher eine Lokalisation von *GSE1* im Zellkern nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zudem gibt es Überlegungen, ob *GSE1* möglicherweise das noch

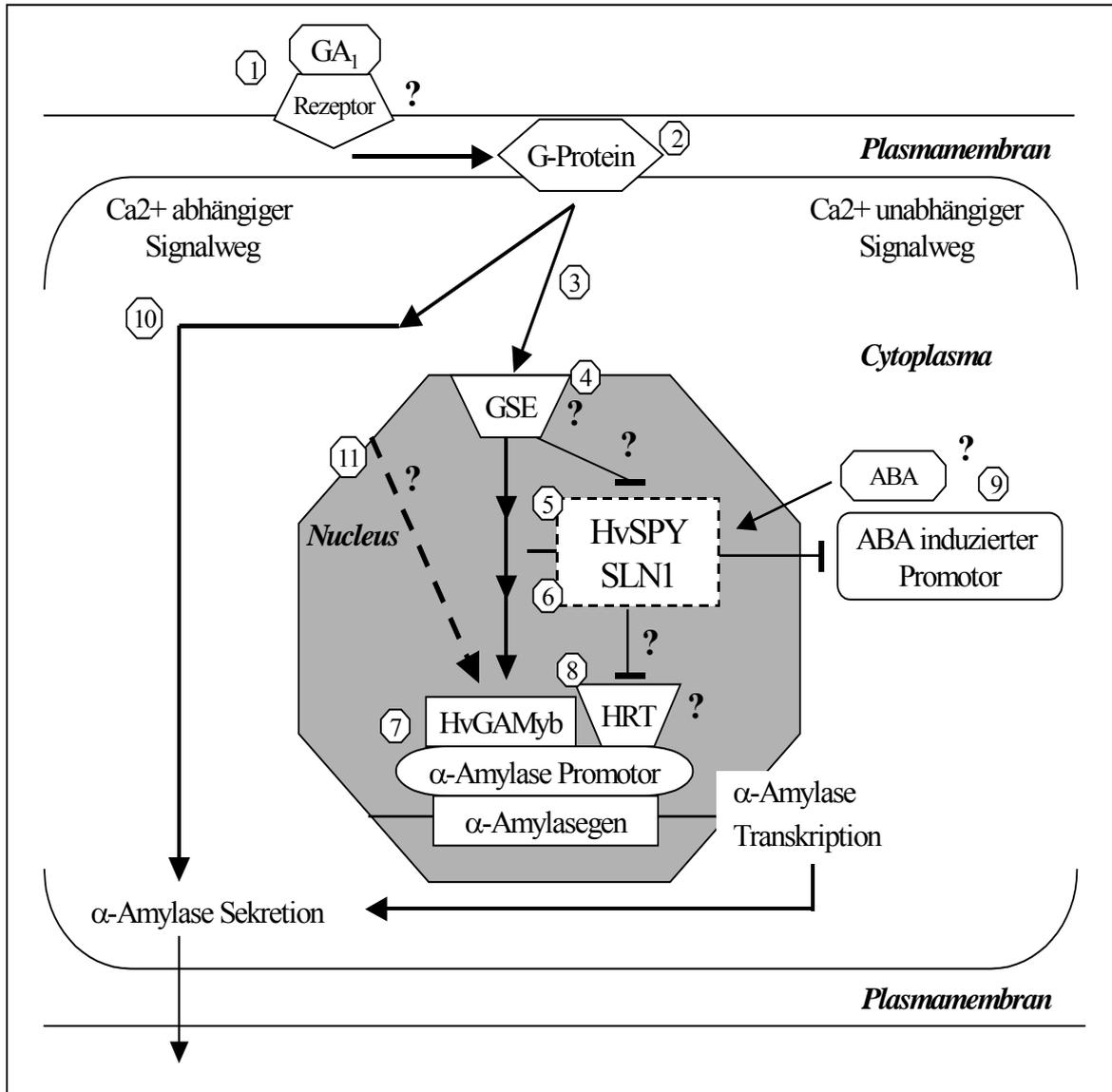


Abbildung 1: Modell der aktuell postulierten GA-Signaltransduktion in der Aleuronschicht der Gerste, welche u.a. die Expression von α -Amylasegenen reguliert (nach OLSZEWSKI et al. 2002) Die ? verweisen auf ungeklärte oder umstrittene Punkte und verdeutlichen den hypothetischen Charakter dieses Modells.

fehlende G-Protein der Gerste codiert. Diese Frage läßt sie aber erst nach der Klonierung von *GSE1* beantworten (OLSZEWSKI et al. 2002). OLSZEWSKI et al. (2002) vermuteten zudem, daß der jüngst im Reis identifizierte positive Regulator *GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1* (*GID1*, Wildtyp-Allel; Übersicht: ASHIKARI und MATSUOKA 2002) eine mit *GSE1* vergleichbare Funktion hat. Allerdings konnte auch für *GID1* eine Position im

Zellkern noch nicht bestätigt werden. **(5)** Der Repressor *SPINDLY* (*SPY*; Wildtyp-Allel; JACOBSEN und OLSZEWSKI 1993; JACOBSEN et al. 1996) wurde in Arabidopsismutanten identifiziert, die in der Lage waren eine durch den GA-Biosynthesehemmer Paclobutrazol (PAC) erzwungene Keimruhe und Verzweigung aufzuheben. Somit mußte es sich bei der *spy* Mutation um eine rezessive Funktionsverlustmutation in einer Repressorkomponente handeln (JACOBSEN und OLSZEWSKI 1993; JACOBSEN et al. 1996). Mittlerweile konnte auch ein orthologes *SPY*-Gen in der Gerste, *HvSPY*, kloniert werden (ROBERTSON et al. 1998). **(6)** Das *SLNI* Gen ist vermutlich das *RGA* (Arabidopsis) funktionsorthologe Gen der Gerste. Beide Repressoren werden offensichtlich mittels Degradation der jeweiligen Proteine deaktiviert, ein Mechanismus der für die Regulation von *GAI* nicht beobachtet werden konnte (GUBLER et al. 2002; SILVERSTONE et al. 2001). Zudem konnte bisher nur für Arabidopsis ein *RGA* bzw. *SLNI* homologes und redundantes Gen wie *GAI* beobachtet werden (IKEDA et al. 2001). ROBERTSON et al. (1998) konnten in ihren Untersuchungen nicht bestätigen, daß es sich bei *HvSPY* um dieses Gen handeln könnte. Unklar ist allerdings immer noch die genaue Beziehung zwischen den Repressoren *SLNI* und *HvSPY* bzw. zwischen *GAI* / *RGA* und *SPY* und inwieweit *SPY* überhaupt der GA-Kontrolle unterliegt (OLSZEWSKI et al. 2002). Aktuelle Ergebnisse lassen auch eine Kontrolle von *SPY* durch Licht oder ein anders Hormon als möglich erscheinen (IZHAKI et al. 2001). Die Analyse der Proteine *SPY* und *GAI* läßt vermuten, daß die *SPY*- der *GAI*-Komponente vorgeschaltet ist und diese, redundant zum positiven Regulator *GSE1* **(4)**, deaktiviert (SILVERSTONE et al. 1998; THORNTON et al. 1999). Die Kernlokalisierung des *SPY* / *SLNI* Komplexes wurde an Hand von *RGA* (SILVERSTONE et al. 1998, 2001) und *OsGAI* / *SLRI* (OGAWA et al. 2000; ITHO et al. 2002) nachgewiesen. **(7)** Der aktivierte Transkriptionsfaktor *H. vulgare GA-induced MYB* (*HvGAMYb*; GUBLER et al. 1995) startet über einen Promotor die α -Amylasetranskription. Mittlerweile sind *MYB* Transkriptionsfaktoren aus unterschiedlichen Pflanzenarten und -geweben bekannt (GUBLER et al. 1995, 1999; CHEN et al. 1997). **(8)** Die Komponente *Hordeum Repressor of*

Transcription (*HRT*, Wildtyp-Allel; RAVENTÓS et al. 1998) fungiert als Repressor, der wie *HvGAMyb* direkt an den α -Amylasepromotor binden kann und vermutlich aus dem *HvSPY* / *SLNI* Komplex heraus gesteuert wird (RAVENTÓS et al. 1998). Allerdings gibt es aktuell noch keine eindeutigen Beweise für eine Kontrolle dieses Repressors durch das GA-Signal (Übersicht: OLSZEWSKI et al. 2002). (9) ROBERTSON et al. (1998) postulierten, daß *HvSPY* mit dem GA-antagonistischen Hormon ABA interagiert. Dabei könnte der inaktivierte Repressor zugleich die Transkription eines ABA induzierten Promotors stoppen und würde andererseits über eine definierte ABA-Konzentration im Cytoplasma aktiviert werden (GUBLER et al. 2002). Bisher konnte allerdings nur bestätigt werden, daß die Interaktion der GA-Signalkette mit ABA zwischen den Komponenten *SLNI* und *HvGAMyb* stattfinden muß, denn die exogene ABA-Applikation führt in den Aleuronzellen der Gerste zu einer Blockade der *HvGAMyb*-Expression, beeinflusst aber nicht die GA-induzierte Inaktivierung der *SLNI* Proteine (GUBLER et al. 2002; GÓMEZ-CADENAS et al. 2001). Die α -Amylasesekretion wird offensichtlich auch über eine Ca^{2+} -abhängige Signalkette (10) (BETHKE und JONES 1998) und eventuell sogar über einen zweiten weniger sensitiven Signalweg (11) aktiviert (UEGUCHI-TANAKA et al. 2000). Die hier genannten Transkriptionsregulatorgene sind auch in Tabelle 1 aufgeführt.

Zusammenfassend läßt sich das aktuelle Modell der Aleuron-GA-Signalkette in drei wesentliche Abschnitte unterteilen (unberücksichtigt bleiben dabei der Signaltransport durch das Cytoplasma und der Ca^{2+} -abhängige Signalweg): Diese bestehen aus der Signalerkennung und -umwandlung an und in der Zellmembran (Rezeptor, *DI*), der Signal- und Transkriptionsregulation durch den *SPY* / *SLNI* (*GAI*, *RGA*) Komplex und der Transkription selbst (*HvGAMyb*, *HRT*), die beide im Zellkern stattfinden. Während der GA-Biosyntheseweg an Hand der identifizierten Mutanten mittlerweile biochemisch und genetisch vollständig aufgeklärt werden konnte, ist über die genetischen Mechanismen der GA-

Kontrolle in der Pflanzenentwicklung bis heute weit weniger bekannt (HEDDEN und PHILLIPS 2000, WEN und CHANG 2002). Im Unterschied zu den Signalketten, die spezifisch für die Regulation des Halmwachstums oder die Blütenbildung sind, wurde die oben beschriebene GA-Kontrolle in Getreidesamen molekulargenetisch intensiv untersucht, dennoch sind auch hier noch viele Fragen ungeklärt (FRIDBORG et al. 2001). Nicht geklärt ist z.B. die Regulation des *SPY / SLN1* Komplexes, sowie die vermutlich unterhalb von *SLN1* stattfindende Interaktion mit der ABA Signalkette. Ebenso fraglich ist, ob der Transkriptionsfaktor *GAMyb* unmittelbar durch *SLN1* gesteuert wird. Aktuelle Ergebnisse, die eine Zeitverschiebung von bis zu 1h zwischen der *SLN1* Degradation und der *GAMyb* Expression gemessen haben, legen die Existenz von mindestens einer weiteren, bisher noch unbekanntem Komponente nahe (GUBLER et al. 2002). Darüber hinaus beurteilte OGAS (1998) die Tatsache als fragwürdig, daß im bisherigen Modell der zellulären Signaltransduktion keine positiven Regulatoren vorkommen. Ein wesentlicher Grund für diese offenen Fragen liegt darin, daß viele Komponenten entweder noch nicht identifiziert oder aber noch nicht kloniert und hinsichtlich ihrer Funktionen analysiert werden konnten (SUN 2000; FRIDBORG et al. 2001). So sind wesentliche Komponenten, wie *GSE1* oder *SLY1*, bisher noch nicht kloniert und lassen deshalb viele Fragen über ihre tatsächlichen Funktionen, z.B. als mögliche positive Regulatoren, offen. Zu den bisher nicht näher charakterisierten Komponenten der Signalkette gehört auch das GA-insensitive Gen *gai* aus der Zwergmutante 'Hv287' der Gerste (FAVRET et al. 1975), dessen Isolierung und Funktionsanalyse deshalb von wissenschaftlichem Interesse ist.

Die fehlenden Bausteine im heutigen Modell der intrazellulären GA-Kontrolle, die viele Zusammenhänge noch im Verborgenen lassen, sind ein generelles Problem, das auch auf andere Signaltransduktionen, wie z.B. die ABA Signalkette, zutrifft. Dennoch wurden in jüngster Zeit große Fortschritte gemacht, die nicht selten aus dem Einsatz der Modellpflanzen *Arabidopsis* und Reis resultierten (FINKELSTEIN et al. 2002; NAKAJIMA und BENFEY 2002).

2.1.3 Verwendung von Zwergmutanten in der landwirtschaftlichen Züchtung

Dem erweiterten Verständnis der hormonellen Steuerung in der Pflanzenentwicklung kommt auch hinsichtlich der gezielten züchterischen Verbesserung der verschiedenen Getreidearten eine zentrale Bedeutung zu (CHORY und WU 2001). Vor allem GA-insensitive Verzweigungsgene konnten bereits ihre Leistungsfähigkeit für die Landwirtschaft unter Beweis stellen. Zwischen den Jahren 1960 und 1970 stieg die weltweite Nahrungsmittelproduktion um mehr als das Doppelte an. Ein Erfolg, der heute als „Grünen Revolution“ bezeichnet wird. Dieser rasche und deutliche Anstieg der Weltnahrungsproduktion war, neben anderen technologischen Neuerungen in der Landwirtschaft (z.B. im Pflanzenschutz), im wesentlichen auch ein Erfolg von Weizen- und Reishochertragsorten, deren auffälligste Gemeinsamkeit in ihrer Kurzstrohigkeit lag (KUSH et al. 1999). Im Jahr 1962 stellte das internationale Mais- und Weizenentwicklungszentrum (CIMMYT) in Mexiko die ersten kurzstrohigen Hochleistungsweizensorten, 'Pitic 62' und 'Penjamo 62', der Landwirtschaft zur Verfügung. Beide Sorten trugen jeweils GA-insensitive Verzweigungsgene, die ursprünglich in der japanischen Weizensorte 'Norin 10' identifiziert worden waren (REIZ und SALOMON 1968; MCINTOSH 1979). Die heute als *Rht-B1b* und *Rht-D1b* (GALE et al. 1975; GALE und MARSHALL 1976) bezeichneten Verzweigungsallele wurden die wichtigsten Gene für die anschließende Züchtung verkürzter Weizensorten.

Der weltweite Erfolg dieser Sorten beruht grundsätzlich auf der Korrelation zwischen reduzierter Wuchshöhe und hoher Ertragsfähigkeit, getragen von einer verbesserten Düngung während der „Grünen Revolution“. Grundsätzlich erhöht die Stickstoffdüngung den Kornertrag, aber gleichzeitig fördert sie auch das Halmwachstum der Getreidepflanzen. Ein unerwünschter Effekt, denn hochgewachsene Pflanzen sind anfällig für Wind und Regen, vor allem bei gleichzeitig erhöhtem Ährengewicht. Lager ist somit eine häufige Ursache für Ertrags- und Qualitätsverluste. Halbzwergpflanzen dagegen reagieren auf die erhöhten Düngergaben mit der erwünschten Ertragssteigerung, aber ohne den negativen Effekt eines

gesteigerten Halmwachstums. Neben der verbesserten Standfestigkeit liegt ein weiterer Vorteil kurzstrohiger Pflanzen in einer effektiveren Ausnutzung großer Dünger- und Wassergaben, vor allem während der Ausbildung des Kornertrags (AUSTIN et al. 1980; GALE und YOUSSEFIAN 1985; ASHIKARI und MATSUOKA 2002). Kurzstrohigkeit meint in diesem Zusammenhang immer eine Halbkurzstrohigkeit und bezeichnet Sorten, die mit Wuchshöhen zwischen 70 und 110 cm gegenüber den langstrohigen Sorten um 30 – 50 cm verkürzt sind. Messungen isogener *Rht-B1b* und *Rht-D1b* Linien ergaben, daß die GA-insensitiven Gene die Wuchshöhe durchschnittlich um 18 % reduzieren (BÖRNER et al. 1993; FLINTHAM et al. 1997).

Das erhöhte Ertragspotential von *Rht*-Sorten resultiert aus einer gesteigerten Produktivität der Ähren. Dadurch nimmt die Kornmasse je Ähre zu, obwohl das durchschnittliche Korngewicht reduziert ist. Darüber hinaus weisen diese Sorten eine relativ höhere Anzahl produktiver Halme je Flächeneinheit auf, bei einer gleichzeitig reduzierten Biomasse (GALE und YOUSSEFIAN 1985). Für die *Rht*-Sorten wurden, gegenüber den normalwüchsigen Pflanzen, maximale Ertragssteigerungen von 15 % gemessen. Das entspricht einem Harvest-Index von 0.425 für die isogenen Zwergpflanzen des Brotweizens, verglichen mit einem Index von 0.370 für die normalwüchsigen Kontrollen (Übersicht: WORLAND und SNAPE 2001). Allerdings ist allen *Rht*-Genotypen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Umweltstreß gemeinsam. Vor allem deutliche Temperaturerhöhungen auf über 24°C in den entscheidenden 10 Tagen vor dem Ährenschieben (LAW und WORLAND 1985) und während der Kornbildungsphase (HOOGENDORN und GALE 1988) haben eine deutliche Reduktion der Erträge zur Folge, jeweils bedingt durch reduzierte Ährenfruchtbarkeit und Korngröße (BÖRNER et al. 1993). Eine vergleichbare Anfälligkeit der kurzstrohigen Hohertragspflanzen wurde auch für die entsprechenden Reissorten beobachtet (FU et al. 2001).

In der Tatsache, daß die Mutation eines einzelnen GA-regulierten Gens eine reduzierte Wuchshöhe mit einem gesteigerten Ertragspotential kombinieren kann, liegt für die

Pflanzenzüchtung ein wesentlicher Vorteil. Denn eigentlich ist die genetische Kontrolle der Wuchshöhe komplex, da viele unterschiedliche Gene daran beteiligt sind. Zudem sind Defekte in diesen Genen größtenteils mit negativen Effekten auf die Ertragsleistung der Pflanze korreliert (LAW et al. 1978; WORLAND et al. 1990; PEREIRA und LEE 1995). Der pleiotrope Wirkungsmechanismus der *Rht*-Allele basiert offensichtlich auf ihrer zentralen Position in der GA-Signalkette, die sich unterhalb dieser Komponenten in verschiedene Kommunikationswege für unterschiedliche Entwicklungsprozesse auffächert (SWAIN und OLSZEWSKI 1996; RICHARDS et al. 2001). Zudem scheinen diese Gene an der Zellkommunikation in mehreren Pflanzenorganen beteiligt zu sein (JACOBSEN et al. 1996; SUN 2000).

Heute sind 21 *Rht*-Allele bekannt, von denen die meisten allerdings kein züchterisches Potential aufweisen (MCINTOSH et al. 1998). Ausnahmen sind wenige Allele an den Weizenchromosomen 4B und 4D. Von den 4B-Allelen - *Rht-B1c*, *Rht-B1d* und *Rht-B1e* - ist bisher nur das *Rht-B1d*-Allel aus der Sorte 'Saitama 27' (WORLAND 1986) kommerziell erfolgreich (WORLAND und PETROVIC 1988). Am *Rht-D1* Locus wurden in der chinesischen Sorte 'Ai-bian' zwei weitere Allele, *Rht-D1b* und *-D1c*, identifiziert, die bisher aber nur in China von züchterischer Bedeutung sind (WORLAND und SNAPE 2001).

Obwohl GA-insensitive Signaltransduktionsgene im Weizen die erfolgreichsten Verzweigungsgene darstellen (BÖRNER et al. 1993), bedeutet dies nicht, daß Gene der GA-Biosynthese keine Bedeutung für die Pflanzenzüchtung haben. Ein Beispiel hierfür sind die kurzstrohigen Reissorten, die Träger des GA-sensitiven Gens *semi-dwarf1* (*sd1*) sind. Im Jahr 1960 entwickelte das Internationale Reisforschungsinstitut (IRRI) die Reissorte 'IR8', die man auf Grund der gesteigerten Erträge als „Wunderreis“ bezeichnete. Diese Sorte wurde der Ausgangspunkt zahlreicher weiterer *sd1*-Sorten, die den *Rht*-Weizensorten vergleichbare agronomische Erfolge erbrachten (ASHIKARI und MATSUOKA 2002). In diesem Zusammenhang ist auch das GA-sensitive *denso* Verzweigungsgen der Gerste zu nennen, das

LAURIE et al. (1993) auf dem langen Arm des Gerstenchromosoms 3H lokalisierten. Mittlerweile ist dieses Gen in europäischen Zuchtsorten weitverbreitet, allerdings kann für das *denso* Gen kein direkter positiver Effekt auf den Ertrag beobachtet werden (THOMAS und SWANSTON 1991). Aktuelle Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Klonierung des *sd1* Gens belegen, daß offensichtlich nur Zwergmutanten mit einer defekten GA-20-Oxidase2 ertragssteigernde Effekte aufweisen, während Mutationen in anderen Biosynthesegenen häufig sogar mit negativen Auswirkungen auf die Pflanzenentwicklung verbunden sind (HEDDEN 2003).

2.2 Kartengestützte Genisolierung

Die Aufklärung molekularer Mechanismen in Stoffwechselfvorgängen oder Signalketten ist in der Regel an die Klonierung der entsprechenden Gene gebunden. Sofern das Produkt des gesuchten Gens bekannt ist, besteht eine Möglichkeit der Klonierung im Übergang vom Phän zum Gen. Die funktionelle Klonierung (COLLINS 1992) setzt aber neben der biologischen Information über das entsprechende Gen, auch die Verfügbarkeit einer Genbibliothek voraus. Dabei lassen sich beispielsweise Antikörper gegen das betreffende Protein herstellen, die mittels Immunoblotting eine Identifikation des entsprechenden Klons in exprimierten cDNA-Banken erlauben. Mit einem solchen cDNA-Klon läßt sich anschließend das zugehörige genomische DNA-Fragment, einschließlich der flankierenden Regulationsbereiche und der eventuellen Intronsequenzen, isolieren. Mittlerweile hat sich auch das Durchsuchen von EST-Datenbanken mit den DNA- oder Aminosäuresequenzen bereits bekannter Gene als erfolgreich erwiesen. So wurde z.B. das Gerstengen *SLNI* an Hand eines *GAI* homologen Reis-ESTs zunächst aus der Gersten cv. Himalaya Aleuron-cDNA-Bank isoliert. Um die vollständige Gensequenz zu erhalten, wurde dieser cDNA-Klon anschließend für eine Sichtung der genomischen 'Morex' DNA-Bank eingesetzt (CHANDLER et al. 2002).

Für viele agronomische Eigenschaften sind keine Genprodukte oder verwandten Gene bekannt. In einem solchen Fall muß der Weg der positionellen Klonierung beschritten werden (COLLINS 1992). Diese beruht auf der genauen Lokalisierung des gesuchten Gens auf dem Chromosom und setzt das Vorhandensein genomischer DNA-Bibliotheken voraus. Die Strategie läßt sich in vier Arbeitsabschnitte gliedern (Übersicht: MELCHINGER 1990; PATERSON 1996):

- (1) Aufbau einer spaltenden Pflanzenpopulation.
- (2) Hochauflösende genetische Kartierung der Region um das Zielgen als Ausgangspunkt für Abschnitt (3)
- (3) Markergestützte Isolierung der zugehörigen genomischen Zielregion
- (4) Verifizierung potentieller Genkandidaten mittels Komplementation oder Mutantenanalysen

Für die genetische Kartierung werden in spaltenden Nachkommenschaften molekulare Marker identifiziert, die eine möglichst enge Kopplung zum Zielgen aufweisen. Hierfür stehen mittlerweile Marker für alle bedeutenden Pflanzenarten zur Verfügung. Allein für die Gerste existieren zahlreiche genetische Karten mit unterschiedlichen molekularen Markersystemen (RFLP: GRANER et al. 1991; HEUN et al. 1991; AFLP: BECKER et al. 1995; WAUGH et al. 1997; SSR: SAGHAI MAROOF et al. 1994; BECKER und HEUN 1995; LIU et al. 1996; RUSSEL et al. 1997; Isoenzym: KLEINHOFES et al. 1993; Protein: ELLIS et al. 1997) sowie zwei Consensuskarten aus jeweils sieben (LANGRIDGE et al. 1995) und vier verschiedenen Kreuzungspopulationen (QI et al. 1996).

Hochmolekulare DNA-Fragmente aus den Banken künstlicher Hefe- oder Bakterienchromosomen (Yeast Artificial Chromosomes (YACs); BURKE et al. 1987 / Bacterial Artificial Chromosomes (BACs); SHIZUYA et al. 1992; WOO et al. 1994) erlauben die Identifikation des physischen Zielintervalls mit flankierenden molekularen Marken. YAC-

Banken wurden mittlerweile für zahlreiche Pflanzen erstellt, dazu gehören u.a. Arabidopsis (GRILL und SOMERVILLE 1991; CREUSOT et al. 1995), Tomate (MARTIN et al. 1992; BONNEMA et al. 1996), Mais (EDWARDS et al. 1992), Reis (UMEHARA et al. 1995) und Gerste (KLEINE et al. 1993, 1997; SIMONS et al. 1997). Entsprechende BAC-Banken existieren u.a. für Pflanzengattungen wie Arabidopsis (CHOI et al. 1995; MOZO et al. 1998), Sojabohne (MAREK und SCHOEMAKER 1997; DANESH et al. 1998; TOMKINS et al. 1999a), Zuckerrohr (TOMKINS et al. 1999b); Sorghum (WOO et al. 1994), Reis (WANG et al. 1995; ZHANG et al. 1996) und Gerste (LAPITAN et al. 1997; WEI et al. 1999; YU et al. 2000). Genomische BAC-Banken wurden bereits erfolgreich für die kartengestützte Klonierung von Resistenzgenen und anderen, lediglich phänotypisch charakterisierten, Genen eingesetzt (Übersicht: SONG et al. 1995). So konnte der *Mla* Resistenzgencluster der Gerste mittels einer kombinierten 'chromosome walking' Strategie in der 'Franka' YAC-Bank und der 'Morex' BAC-Bank identifiziert werden (KLEINE et al. 1993, 1997; WEI et al. 1999). Genomische YAC-Banken ermöglichten die kartengestützte Klonierung von zwei weiteren Mehltau-Resistenzgenen der Gerste, *Mlo* und *Rar1* (BÜSCHGES et al. 1997; SIMONS et al. 1997; LAHAYE et al. 1998b; SHIRASU et al. 1999).

Der kritische Punkt einer kartengestützten Klonierung liegt im notwendigen Wechsel von der genetischen Kartierung, basierend auf Rekombinationseinheiten, zur physischen YAC- / BAC-Kartierung, basierend auf Basenpaaren (TANKSLEY et al. 1995). Zwischen den genetischen und physischen Distanzen besteht i.d.R. kein direkter Zusammenhang (MEAGHER et al. 1988). So können die cM / Mb Verhältnisse je nach Chromosomenregion intraspezifisch, aber auch je nach Genomgröße interspezifisch stark variieren (PANSTRUGA et al. 1998). Die Marker, die für das Screening der genomischen Banken eingesetzt werden, sollten innerhalb einer physischen Distanz um das Zielgen liegen, die kleiner ist als die durchschnittliche Insertlänge der untersuchten genomischen DNA-Bank. Nur dann läßt sich die Richtung eines 'chromosome walking' kontrollieren oder ein gezieltes 'chromosome

landing' durchführen (ORKIN 1986, Young 1990, TANKSLEY et al. 1995). Die erforderliche genetische Auflösung, mit der sich entsprechend eng gekoppelte Marker positionieren lassen, kann nur in einer genetisch hochauflösenden Population erreicht werden, deren Aufbau aber immer mit großem Aufwand verbunden ist. So wurden für die hochauflösende Kartierung des *Rar1* Locus auf dem Gerstenchromosom 2H jeweils 4310 / 3270 F₂ Pflanzen für die genetischen Intervalle distal / proximal vom *Rar1* Locus untersucht, was einer genetischen Auflösung von 0,012 / 0,015 cM entspricht. Erst nach der Positionierung eines 0,015 cM entfernten und eines mit *Rar1* cosegregierenden Markers konnte ein 'chromosome landing' in der YAC-Bank erfolgreich durchgeführt werden (LAHAYE et al. 1998a, 1998b). Damit hatte sich erwiesen, daß eine 'chromosome landing' Strategie auch im komplexen Gerstengenom erfolgreich sein kann, sofern ausreichend eng gekoppelte Marker verfügbar sind. Denn mit Ausnahme des *Mlo* Locus (BÜSCHGES et al. 1997; SIMONS et al. 1997) konnte diese Strategie bisher nur bei Pflanzen mit relativ kleinen Genomen, wie *Arabidopsis* (Übersicht: SCHMIDT 1998), Tomate (MARTIN et al. 1993; DIXON et al. 1996; BALLVORA et al. 2001) und Reis (SONG et al. 1995; YOSHIMURA et al. 1998) erfolgreich eingesetzt werden.

Auf Grund der ungünstigen genetisch - physischen Verhältnisse, die häufig in komplexen Pflanzengenomen beobachtet wurden (CIVARDI et al. 1994; LAHAYE et al. 1998b), sind YAC-Klone mit ihren relativ großen Inserts von durchschnittlich 480 kb (SIMONS et al. 1997) gegenüber den kleineren BAC-Inserts mit durchschnittlich 100 bis 150 kb (TAO et al. 1994; WANG et al. 1995; ZHANG et al. 1996; YU et al. 2000) in der physischen Kartierung im Vorteil. Allerdings bringt das YAC-System einige charakteristische Probleme mit sich, welche die Handhabung nicht selten beeinträchtigen (ZHANG und WING 1997). So wurden in unterschiedlichen Banken regelmäßig chimäre YAC-Klone beobachtet (Arabidopsis: CREUSOT et al. 1995; Reis: UMEHARA et al. 1995; ZHANG et al. 1996; Gerste: SIMONS et al. 1997). In BAC-Banken wurden derartige Artefakte dagegen wesentlich seltener beobachtet (WOO et al. 1994; ZHANG et al. 1996). Ein weiteres Problem liegt in der Instabilität von YAC-

Klonen, die sich zumeist in einer deutlichen Verkürzung der YAC-Sequenzen bemerkbar macht. Solche Deletionen sind ein großes Problem, bedeuten sie doch einen möglichen Verlust wichtiger Sequenzinformationen (DUNFORD et al. 1993; MICHALEK et al. 1997). Das BAC-System zeichnet sich dagegen vor allem durch seine bessere Handhabung und große *in vivo* Stabilität aus. Auch läßt sich BAC-DNA leichter aufreinigen als YAC-DNA, die nur schwer von der genomischen DNA des Hefewirts gereinigt werden kann (JIANG et al. 1995).

Für die weitere genetische Analyse von YAC- und BAC-Klonen können aus den Insertionen spezifische cDNA-Banken erstellt werden, deren Klone sich über eine Sequenzierung oder genetische Kartierung hinsichtlich potentieller Kandidaten analysieren lassen. Eine andere Möglichkeit besteht in der vollständigen Sequenzierung und Analyse der genomischen Zielregion, vorausgesetzt diese Region ist bereits ausreichend reduziert. YAC- und BAC-Sequenzen müssen hierzu fragmentiert und als 'Shot Gun'-Klonbibliothek sequenziert und anschließend zur vollständigen Sequenz zusammengefügt werden, dabei sind i.d.R. Informationen von 5 - 10 kb notwendig um eine 1 kb Sequenz zusammenfügen zu können (PRIMROSE 1996). Für die Erstellung einer publikationsreifen DNA-Sequenz in einem der zahlreichen Unternehmen, die einen Sequenzierservice anbieten, liegen die Kosten bei ca. 2500 Euro für eine 10 kb lange Sequenz (Übersicht von 2001: <http://www.laborjournal.de/rubric/produkte/products3/P01-06-A3.pdf>). Neben der direkten Sequenzierung bietet die 'Sample-Sequence (SASE)'-Methode die Möglichkeit einer schnellen und kostengünstigen Analyse großer Genomregionen im Hinblick auf die Lokalisierung und Identifizierung von Genen. Im Unterschied zur 'Shot Gun'-Methode wird hierbei zunächst nach dem Zufallsprinzip nur eine kleine Anzahl von Subklonen für die Sequenzierung ausgewählt. Damit können pro YAC- / BAC-Klon ca. 70 % der vollständigen Sequenz abgedeckt werden, ausreichend um Gene oder / und neue EST-Sonden in den Sequenzen zu identifizieren (DOGGETT et al. 1995).

Der abschließende Nachweis für eine erfolgreiche Genisolierung erfolgt über Komplementationsversuche und Mutantenanalysen. Für die molekulare Charakterisierung eines Gens von dem nur die Sequenz bekannt ist stehen unterschiedliche 'reverse genetics'-Methoden aus der funktionellen Genomanalyse zur Verfügung, die einen Übergang vom Genotypen zum Phänotypen ermöglichen. Gentransfer und Inaktivierung des Zielgens sind die beiden grundsätzlichen Strategien die eingesetzt werden können. In beiden Fällen erfolgt die Charakterisierung des Zielgens an Hand einer erkennbaren präzisen Mutation. Der Gentransfer erfolgt mittels einer Transformation der Zielpflanze über die homologe Rekombination, dabei stehen für Pflanzen zwei Transfersysteme zur Verfügung. Bei der Partikelbombardierung werden Goldpartikel mit der Fremd-DNA unter Hochdruck in das Pflanzengewebe geschossen. Das natürliche Gentransfersystem nutzt *Agrobacterium* als Vektor für den Transport der Fremd-DNA. Die Partikelbombardierung konnte bereits erfolgreich in der Gerste eingesetzt werden, allerdings senkten eine fehlende Stabilität der Transformation und ein Verlust der Regenerationsfähigkeit transgener Gerstenpflanzen die Transformationsfrequenzen merklich und beeinträchtigen die Effizienz dieser Methode (HAGIO et al. 1995; KOPREK et al. 1996; HARWOOD et al. 2000). Eine wesentliche Verbesserung verspricht die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation, für die es mittlerweile vielversprechende Protokolle gibt und die zunehmend, die bisher vorherrschende Partikelbombardierung ablöst (TINGAY et al. 1997; FANG et al. 2002). So erwies sich *Agrobacterium tumefaciens* für die Komplementation des Resistenzgens *Rpg1* der Gerste als geeigneter Vektor, dabei konnte das transformierte Konstrukt erfolgreich in das Genom der anfälligen Linie integriert und die anschließende Komplementation dieser Linie zu einer resistenten Pflanze nachgewiesen werden (HORVATH et al. 2003).

Für die Strategie der Inaktivierung des Zielgens bzw. Zielproteins stehen für Pflanzen vier Techniken zur Verfügung. In der Antisense-RNA- und der RNAi (RNA Interferenz)-Suppression wird, jeweils über die Integration von antisense ssDNA und dsRNA, die Bildung

des Zielproteins unterdrückt (WATERHOUSE et al. 1998, 2000; SCHWEIZER et al. 2000; AKASHI et al. 2001; GUO et al. 2003). Die Insertionsmutagenese erzeugt Funktionsverlustmutationen über die Integration transponierbarer Elemente in codierende Sequenzen. In der Gerste wurden hierfür mittlerweile sowohl das En / Spm (SCHAEFER et al. 2000), als auch das Ac / Ds Element (KOPREK et al 2000; 2001; SCHOLZ et al. 2001) aus dem Mais etabliert. Die TILLING (Target Induced Local Lesions IN Genomes)-Strategie ist vor allem im Hinblick auf die Gerste von Interesse, da sie im Unterschied zu den oben genannten Techniken keine Transfersysteme oder endogenen Tagging-Systeme benötigt. Dadurch kann TILLING quasi für jeden Organismus eingesetzt werden und ist vor allem für diejenigen Pflanzen interessant, für die kein effizientes und stabiles Transformationssystem existiert. Die TILLING-Strategie basiert auf der hohen Dichte und der effizienten Nachweisbarkeit von Punktmutationen, die zu einem Funktionsverlust von Genen geführt haben. Dabei wird die ungezielte chemische EMS (Ethylmethansulfonat) Mutagenese mit einem schnellen, weil automatisierbaren Screening der EMS-Mutanten kombiniert. Für den Aufbau der Mutantenpopulation werden die Samen einer für das untersuchte Merkmal homozygoten Einzelpflanze mit EMS behandelt, anschließend wird die DNA der Mutanten für das PCR-basierte Screening gepoolt. An Hand von Primern, die spezifisch für die Sequenz des Zielgens sind, werden die gesuchten DNA-Fragmente detektiert und anschließend hinsichtlich vorhandener Punktmutationen analysiert, wofür sich die DHPLC-Technik als effektiv erwiesen hat. In einem hierarchischen Verfahren kann schließlich die EMS-Mutante mit einer Funktionsverlustmutation im Zielgen identifiziert werden und für den Nachweis der Komplementation dienen (MCCALLUM et al. 2000; COLBERT et al. 2001; PERRY et al. 2003). Aktuell wird, vergleichbar dem Arabidopsis TILLING-Projekt (ATP, GREENE et al. 2003), das europäische Getreidenetzwerk CROPTIL (**CROP TILLING**) aufgebaut, daß der Entwicklung und Verbesserung der TILLING Strategie für landwirtschaftlich bedeutende Getreidepflanzen, wie u.a. Reis, Weizen, Gerste und Roggen, dient (<http://www.evry.inra.fr/public/projects/tilling/tilling.html>)

2.3 Vergleichende Genomanalyse: Gräser als genetisches System

Zur Familie der Süßgräser (Poaceae) gehören so bedeutende Nutzpflanzen wie Weizen (*Triticum aestivum* L.), Gerste (*Hordeum vulgare*), Roggen (*Secale cereale* L.), Hafer (*Avena sativa* L.), und Reis (*Oryza sativa* L.). Die Unterfamilie der Triticeae umfaßt mehr als 15 Gattungen und 300 Arten, zu denen u.a. der Weizen und die Gerste gehören. Die jeweiligen Genomgrößen der wichtigsten Kulturpflanzen unter den Gräsern variieren zwischen dem Reis auf der einen Seite, der mit 415 Mb (12 Chromosomen) das kleinste Genom besitzt, und dem Weizen auf der anderen Seite, der mit 16.000 Mb (21 Chromosomen) das größte Genom aufweist. Allerdings resultiert die Genomgröße des Brotweizens aus seinem hexaploiden Charakter und ist, davon einmal abgesehen, nahezu identisch mit der Genomgröße der Gerste, die bei 5.000 Mb liegt (ARUMUGANATHAN und EARLE 1991).

Die Fortschritte der markerbasierten genetischen Analyse in den vergangenen 10 Jahren lieferten zunehmend Hinweise auf konservierte Marker- und Genanordnungen zwischen unterschiedlichen Arten aus der Poaceae-Familie. Die Anfänge der gezielten vergleichenden Analyse lagen zunächst bei den dicotylen Solanaceen Tomate, Kartoffel und Paprika (BONIERBALE et al. 1988; TANKSLEY et al. 1988; TANKSLEY et al. 1992; PRINCE et al. 1993) sowie den Kruziferenarten *Arabidopsis thaliana* und *Brassica oleracea* (KOWALSKI et al. 1994). In der Zwischenzeit wurde für Gräsergenome die größte Datensammlung für unterschiedliche Pflanzengenome aus einer Familie erarbeitet.

2.3.1 Sequenzorganisation und -konservierung

Die Grundlage für die vergleichende Genomanalyse lieferte letztlich die RFLP-Technik (SOUTHERN 1975), die es ermöglichte sequenzhomologe DNA-Fragmente in verwandten Arten nachzuweisen (VAN DEYNZE et al. 1998; DEVOS und GALE 2000). Zwar waren die homoeologen Beziehungen zwischen den Chromosomen von Weizen, Gerste und Roggen auf Grund einer Vielzahl von cytogenetischen und Isoenzym-Marker-Analysen schon

lange bekannt (SEARS et al. 1954; HART 1987), aber erst die RFLP-Markertechnik erlaubte den Austausch von Markern zwischen unterschiedlichen Genomen und damit eine gezielte Analyse der bestehenden Verwandtschaftsbeziehungen. Auf diese Weise wurden zunehmend konservierte Markieranordnungen innerhalb definierter Genomregionen der Triticeae entdeckt. Schließlich veröffentlichten MOORE et al. (1995) die erste integrierte Markerkarte, die unter Verwendung des Reisgenoms als Referenz, die Genome von sieben Arten miteinander verknüpfte und die seitdem beständig weiterentwickelt wurde (VAN DEYNZE et al. 1995; BENNETZEN und FREELING 1997; GALE und DEVOS 1998). Aktuell werden insgesamt 10 Gräsergenome an Hand von 30 Reiskopplungsblöcken beschrieben (DEVOS und GALE 2000). Darüber hinaus liegt heute eine definierte Sammlung von gut konservierten Ankermarkern vor, die sich während der Entwicklung vergleichender genetischer Karten bewährt haben (VAN DEYNZE et al. 1995, 1998). Dabei zeigten besonders EST- bzw. cDNA-Sonden ihre Effektivität in Kreuzhybridisierungen. Denn während genomische DNA nur bedingt zwischen den Arten übertragbar ist, repräsentieren EST / cDNA-Sonden Gene, die i.d.R. einen hohen Grad an Konservierung zwischen den Arten aufweisen und frei von repetitiven Sequenzen sind (LAURIE et al. 1995; BARAKAT et al. 1997). Bereits BONIERBALE et al. (1988) bemerkten in ihren Vergleichskartierungen zwischen Tomate und Kartoffel den hohen Konservierungsgrad von cDNA-Markern.

Es ist heute eine akzeptierte Auffassung, daß zahlreiche Gene zwischen den einzelnen Poaceae-Arten in ihrer chromosomalen Position und Anordnung konserviert sind. Dabei steht der Grad der Konservierungen offensichtlich in einem Zusammenhang mit dem jeweiligen Verwandtschaftsgrad. So sind die gefundenen Ähnlichkeiten innerhalb der Triticeae-Gattungen i.d.R. größer, als die Ähnlichkeiten zu Vertretern anderer Unterfamilien der Poaceae (SANDHU und GILL 2002). Genomvergleiche mittels Ankermarkern zeigten, daß der Grad der Konservierung zwischen Reis (*Oryzeae*) und Mais (*Andropogonoideae*), die sich vor ca. 66 Millionen Jahren getrennt hatten (THOMASSON 1987), bei 62 % liegt (AHN und

TANKSLEY 1993). Im Vergleich dazu lag dieser Wert zwischen den Triticeae-Gattungen Weizen, Gerste und Hafer bei 94 % (VAN DEYNZE et al. 1995). Diese haben sich erst vor ca. 10 - 14 Millionen Jahren von einem gemeinsamen Vorfahren getrennt (WOLFE et al. 1989). Allerdings ist die Korrelation zwischen Verwandtschafts- und Konservierungsgrad nicht immer eindeutig. So stellten DEVOS et al. (1993) in ihren Untersuchungen fest, daß Gerste und Weizen einen höheren Grad an Konservierungen aufweisen als Weizen und Roggen, obwohl der Roggen eigentlich der nähere Verwandte zum Weizen ist. Entsprechendes wurde auch für die Gerste und die Wildgräser *A. tauschii* und *A. umbellulata* beobachtet. Dabei zeigte die Gerste einen deutlich höheren Konservierungsgrad mit *A. tauschii* (DUBCOVSKY et al. 1996) als die beiden *Aegilops*-Arten untereinander, obwohl diese näher miteinander verwandt sind (ZHANG et al. 1998). Offensichtlich weisen die Genome einiger Pflanzen, wie z.B. des Roggens, eine höhere evolutionäre Transpositionsrate und damit einen höheren Grad an chromosomalen Umbrüchen auf (DEVOS und GALE 2000). Trotz der beobachteten Korrelation zwischen Verwandtschaft und Genomkonservierung sind selbst zwischen Gattungen, die seit über 60 Millionen Jahren getrennte Wege gehen ganze Chromosomensegmente nahezu unverändert erhalten geblieben (DEVOS et al. 1994; DEVOS und GALE 1997; KELLER und FEUILLET 2000).

Oft werden konservierte Marker- und Genanordnungen in zwei unterschiedlichen Genomen als syntän bezeichnet. Ursprünglich bezeichnete die Syntänie mindestens zwei Genloci, die auf demselben Chromosom liegen und bezog sich dabei lediglich auf die physische Kartierung (KELLER und FEUILLET 2000). Heute wird dieser Begriff in der vergleichenden Genomanalyse gerne mit dem der Colinearität gleichgesetzt, der eigentlich das Vorhandensein einer konservierten Markerreihenfolge bezeichnet (ECKARDT 2001).

Betrachtet man die Struktur der Gräsergenome, so fällt als erstes auf, daß diese einem Konglomerat aus genfreien und genreichen Regionen gleichen. Entsprechende Untersuchungen im Weizens lassen vermuten, daß 85 % der Weizengene in Regionen

angesiedelt sind, die weniger als 10 % des Genoms ausmachen (GILL et al. 1996a, 1996b; SANDHU et al. 2001). Dabei wurden auf jedem Weizenchromosom sechs bis acht Geninseln identifiziert, die zusammen nicht mehr als 10 % der jeweiligen Chromosomen abdecken (SANMIGUEL et al. 1996; BARAKAT et al. 1997; LLACA und MESSING 1998; FEUILLET und KELLER 1999; SANDHU et al. 2001). Für die Gerste wurde eine vergleichbare Aufteilung der Genomstruktur beobachtet. In der genetisch integrierten physischen Karte mit 240 Translokationsbruchpunkten tragen nur 4,9 % des Genoms allein 47,4 % der untersuchten 429 Markerloci. Für das Gerstenchromosom 2H wurden 5 Regionen identifiziert, die nur 24 % der Chromosomenlänge ausmachen und 81 % aller Marker enthalten (KÜNZEL et al. 2000). Aber auch in den weniger komplexen Genomen, wie dem Reis- und Maisgenom, besetzen die codierenden Regionen nicht mehr als 24 % (BARAKAT et al. 1997) und 17 % (CARELS et al. 1995) des gesamten Genoms. Offensichtlich handelt es sich hierbei um eine allgemeine Tendenz, die allen Genomen der Poaceae-Familie gemeinsam ist. Innerhalb der Triticeae-Unterfamilie wurde eine durchschnittliche Gendichte von 10 bis 20 Genen pro 100 kb gemessen, die einer Gendichte von 15 bis 25 Genen im Reis vergleichbar ist (SANDHU und GILL 2002). Die durchschnittliche Gendichte von *Arabidopsis* liegt ebenfalls bei 20 Genen pro 100 kb (QUIGLEY et al. 1996). Unter den Triticeae bilden die *Lrk10* Region des Weizens mit einem Gen alle 4,6 kb (FEUILLET und KELLER 1999) und die *Mlo* Region der Gerste mit einem Gen alle 20 kb (PANSTRUGA et al. 1998) die maximalen und minimalen Eckpunkte der bisher gemessenen Gendichten. Zum Vergleich, in der 340 kb umfassenden *Adh1-Adh2* Region im Reis lag die Gendichte bei einem Gen alle 10,3 kb (TARCHINI et al. 2000). Diese Beobachtungen sind Indizien dafür, daß die beträchtlichen Größenunterschiede innerhalb der Gräsergenome sich nicht notwendigerweise in entsprechenden Unterschieden in den Genabständen widerspiegeln. Durch die Anordnung der Gene in relativ kleinen Genomregionen liegen die gemessenen Genabstände selbst in großen Genomen, wie Gerste und Weizen, weit unter der theoretischen Erwartung von einem Gen alle 250 kb, die noch auf

einer gleichmäßigen Verteilung der Gene über das Genom basierte (FEUILLET und KELLER 1999, 2002; SANDHU und GILL 2002).

Blickt man aus der "Vogelperspektive" auf ein Genom, so entsteht der Eindruck, daß hier relativ kleine, aber in sich geschlossene Geninseln in einem Meer aus nicht codierender DNA liegen. Diese nicht codierenden Regionen bestehen aus repetitiver DNA, die sich zu großen Teilen aus unterschiedlichen mobilen DNA-Elementen zusammensetzt (SANMIGUEL et al. 1996; BARAKAT et al. 1997; LLACA und MESSING 1998; FEUILLET und KELLER 1999; SANDHU et al. 2001). Bei näherer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, daß auch diese genreichen Regionen aus kleineren Subregionen bestehen, die von mobilen repetitiven DNA-Elementen separiert werden. Beispielsweise sind diverse Retroposons in den homologen *Adh1* Regionen von Mais und Sorghum für die unterschiedlichen Genabstände verantwortlich (SANMIGUEL et al. 1998). Aber weder die Verteilung, noch die Größe dieser intergenischen Regionen scheinen dabei einem bestimmten Muster zu folgen und sind offensichtlich die Folge zufälliger Ereignisse (SANMIGUEL et al. 1996; BARAKAT et al. 1997; FEUILLET und KELLER 1999). Darüber hinaus konnten Untersuchungen nachweisen, daß die Exons zwischen orthologen Gräsergenen hochgradig konserviert sind. Die Positionen der Introns sind zwar ebenfalls konserviert, aber in ihrer jeweiligen Länge können sie sich unterscheiden. Allerdings nicht in dem Maße, daß von einer Korrelation mit den unterschiedlichen Genomgrößen gesprochen werden kann (DUBCOVSKY et al. 2001).

2.3.2 Mechanismen der Genomevolution

Die fortschreitende Aufklärung der generellen Architektur von Gräsergenomen lieferte zunehmend auch Hinweise auf die Ursachen, sowohl für die beobachtete Variabilität als auch für die Konservierungen zwischen unterschiedlichen Genomen. Auf Grund dieser Daten steht heute außer Frage, daß neben der Polyploidisierung die nicht codierenden DNA-Segmente für die eklatanten Größenunterschiede in den Genomen der Poaceae verantwortlich sind. Diese

nicht codierenden Regionen bestehen zu einem großen Teil aus mobilen DNA-Elementen wie Transposons und Retroposons. Während Transposons über ein DNA-Intermediat mobilisiert werden, erfolgt die Transposition bei Retroposons über einen RNA-Intermediat. Die wiederholten Integrationen dieser Elemente ließen die intergenischen Sequenzen durch Insertionen auf einen riesigen Raum anschwellen, mit dem Ergebnis eines scheinbaren Mißverhältnisses zwischen codierender und nicht codierender DNA in vielen Genomen (BENNETZEN 1997; WESSLER 1997; FEDOROFF 2000). Auf diese Weise verdoppelten unterschiedliche Retroposons das Maisgenom innerhalb der letzten 3 Millionen Jahre. Allein in der 280 kb umfassenden *Adhl* Maisregion wurden 37 verschiedene Typen von transponierbaren und repetitiven DNA-Elementen nachgewiesen, die mehr als 70 % der untersuchten Region ausmachen (SANMIGUEL et al. 1996). In der Gerste und im Weizen bestehen ~80 % des gesamten Genoms aus repetitiver DNA (SANMIGUEL et al. 1998).

Die Sequenzen dieser mobilen DNA-Elemente sind offensichtlich selbst zwischen näher verwandten Arten nicht sehr homolog. Mittlerweile wurden neben den familienspezifischen (Poaceae: ZHANG et al. 1995), vor allem art- und gattungsspezifische Retroposons (Sorghum: KUMAR et al. 1990; Weizen: PESTOVA et al. 1998; Hafer: LINARES et al. 1999) identifiziert. Somit sind Genome beständig den Insertionen einer Vielzahl unterschiedlicher Retroposons ausgesetzt. ZHANG et al. (1995) identifizierten fünf mobile Sequenzen, die alle im Mais und im Weizen existieren und offensichtlich bereits im Genom des gemeinsamen Vorfahren vorhanden waren. Allerdings konnte nur eine dieser fünf Sequenzen auch im Hafer nachgewiesen werden. Ein Hinweis darauf, daß neben den art- oder gattungsspezifischen Multiplikationen und Neubildungen von Retroposons auch spezifische Verluste von repetitiven DNA-Elementen möglich sind (SANDHU und GILL 2002).

Eine weitere, nicht unwesentliche Ursache für die Expansion von Genomen liegt in den Duplikationen und Insertionen ganzer Sequenzabschnitte, die keine Ähnlichkeit mit mobiler DNA aufweisen (FEUILLET et al. 2001). Detaillierte Kartierungen und Sequenzanalysen

bestätigten, daß sogar Pflanzen mit wenig komplexen Genomen wie z.B. Reis und Arabidopsis, eine große Anzahl verdoppelter Segmente enthalten. Die nahezu gesättigten Kopplungskarten von Reis und Arabidopsis illustrieren, daß neben kleineren Segmenten sogar ganze Chromosomenarme dupliziert sein können (KISHIMOTO et al. 1994; NAGAMURA et al. 1995). Nimmt man diese Sequenzen zum Maßstab, dann sind mindestens 60 % des Genoms von Arabidopsis dupliziert, was auf eine tetraploide Vergangenheit hinweisen könnte (BLANC et al. 2000). Im Mais führten regelmäßig auftretende Sequenzverdopplungen immer wieder zu Problemen in der genetischen Kartierung. Diese tandemartigen Verdoppelungen ganzer Genomregionen sind häufig die Folge von nicht homologen Rekombinationen, von Translokationen und von Insertionen transponierbarer Elemente (SANZ-ALFEREZ et al. 1995).

Angesichts der Omnipräsenz von Faktoren, die chromosomale Umlagerungen hervorrufen können, stellt sich die Frage nach den antagonistischen Faktoren, welche für die beobachteten colinearen Beziehungen in Genregionen verantwortlich sein könnten. Auffällig ist, daß sich die relativ großen repetitiven DNA-Blöcke vorwiegend in den genfreien Zwischenräumen angesiedelt haben. Zwei Gründe hierfür werden diskutiert: Erstens scheinen mobile DNA-Elemente vorzugsweise in flankierende chromosomale Positionen zu transponieren (VAN SCHAİK und BRINK 1959; GREENBLATT und BRINK 1962). Zweitens bestehen genreiche Regionen aus Genketten, die i. d. R. für die Fortpflanzungs- und Überlebensfähigkeit des Organismus von entscheidender Bedeutung sind. Mutationen in diesen Genen dürften generell vom Selektionsdruck nicht toleriert werden. Hier liegt vermutlich einer der wesentlichen Gründe warum transponierbare DNA-Elemente in diesen Regionen hinsichtlich ihrer Position, ihrer Größe und ihrer Transpositionsrate eingeschränkt sind (BENNETZEN et al. 1997, 1998; PANSTRUGA et al. 1998; DUBCOVSKY et al. 2001). Offensichtlich spielt in diesen Regionen auch die Selbstinaktivierung von Retroposons durch gegenseitige Insertionen eine nicht unwesentliche Rolle (SANMIGUEL et al. 1996). Deshalb könnte die Häufigkeit repetitiver

DNA-Elemente ein guter Indikator für die Bedeutung sein, die den umgebenden Genen für die allgemeine Vitalität der Pflanze zu kommt (SANDHU und GILL 2002). In wie weit allerdings für bestimmten Genregionen von einer signifikanten Korrelation zwischen der Stabilität einer Genanordnung und der Überlebensfähigkeit der Pflanze ausgegangen werden kann, ist unter Forschen noch umstritten (BENNETZEN 1997). MCCLINTOCK (1984) postulierte für mobile DNA Elemente eine wesentliche evolutionäre Bedeutung, dabei sollen diese vor allem in Streßsituationen ihr mutagenes Potential zeigen, indem sie zahlreiche chromosomale Umlagerungen auslösen und dadurch die Chance auf eine positive Mutation erhöhen. Dagegen vermutete BENNETZEN (2000), daß die mutagenen Effekte der mobilen Elemente regelmäßig und unabhängig vom Umweltstreß auftreten, zumal die verwandten Arten zwar deutliche Unterschiede in der Genomgröße aufweisen, dafür aber zuwenig Unterschiede in den jeweiligen Genregionen, denn diese müßten die eigentliche Wirkungsstätte einer effektiv gesteigerten Mutabilität sein.

2.3.3 Die Reispflanze als Gräsermodell

Der Kulturreis (*Oryza sativa*) ist heute ein Grundnahrungsmittel für mehr als 50 % der Weltbevölkerung und wird als Tiefland-, Hochland- und Naßreis angebaut. Die Hauptanbaugebiete liegen in Asien (90 %), wo der Reis hauptsächlich als Naßreis kultiviert wird. Die Reiszüchtung kann auf eine mehr als 700-jährige Tradition zurückblicken (KURATA et al. 1994). Dabei wurden immer wieder neue Reissorten geschaffen, die sich sowohl durch höhere Ernteerträge, als auch durch gesteigerte Qualitätseigenschaften, eine verbesserte Anpassungsfähigkeit an die unterschiedlichsten Anbaugebiete und eine erhöhte Streßtoleranz auszeichneten.

Mittlerweile ist der Reis im Bereich der Getreideforschung ein herausragendes System für genetische und molekulare Studien, die zum Teil recht unterschiedlichen Zielen dienen. Seine Funktion als Modellgenom verdankt der Reis vier essentiellen Eigenschaften:

- (1) Mit 430 Mb ist das Reisgenom nur 3,5-mal größer als das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis* (BENNETT und SMITH 1976; ARUMUGANATHAN und EARLE 1991). Das relativ kleine Genom resultiert aus der diploiden Struktur ($2n = 2x = 24$) und dem, verglichen mit anderen komplexeren Getreidegenomen, geringen Gehalt an repetitiver DNA (BENNETZEN et al. 1998).
- (2) Auf Grund seiner günstigen Genomgröße und seiner landwirtschaftlichen Bedeutung ist der Reis heute das Objekt groß angelegter Forschungsprojekte. Dazu gehören das japanische Reis-Genom-Programm (RGP, Tsukuba, Japan) und das internationale Reis-Genom-Sequenz-Projekt (IRGSP, Übersicht: ECKARDT 2000; SASAKI und BURR 2000; BARRY et al. 2001; BURR 2002) unter der Federführung von Japan und den USA, das seit seinem Start im Jahre 1997 zahlreiche genetische und molekulare Ressourcen bereit gestellt hat (Übersicht: GOFF 1999).
- (3) In der Reistransformation wurden große Fortschritte gemacht, die mittlerweile eine routinierte Anwendung ermöglichen (CHEN et al. 1998a). In Verbindung mit den verfügbaren genetischen und molekularen Ressourcen wird der Reis dadurch zu einem optimalen Organismus für Mutantanalysen, reverse Genetik und Insertionsmutagenese, die der Ermittlung von Genen und Genfunktionen dienen (ECKARDT 2000).
- (4) Das zunehmend sequenzierte Reisgenom erlangte immer mehr an Bedeutung für die vergleichende Genomanalyse innerhalb der Gräser. Aktuelle Erkenntnisse belegen, daß die Architektur des Reisgenoms durchaus als Strukturmodell für andere Getreidepflanzen dienen kann (KURATA et al. 1994; HAVUKKALA 1996; IZAWA und SHIMAMOTO 1996; TAO et al. 2001).

Das *Arabidopsis*-Genom mit seinen ebenfalls zahlreichen genomischen Ressourcen alternativ zum Reis als Modell für Gräsergenome zu verwenden, stellte sich dagegen als wenig

aussichtsreich heraus. Zwischen den monocotylen Gräsern und der dicotylen Pflanze *Arabidopsis* liegen schätzungsweise 120 - 200 Millionen Jahre getrennter Entwicklung (WOLFE et al. 1989). Folglich sind konservierte Regionen und Gene zwischen Gräsern und *Arabidopsis* eher selten und mittels vergleichender Kartierung fast nicht mehr nachweisbar (DEVOS et al. 1999). Die Annahme, daß wenigstens 43 bis 53 % der Gene zwischen beiden Gattungen konserviert sein sollten (PATERSON et al. 1996), konnte in entsprechenden Untersuchungen mit Reis und Gerste als Gräserrepräsentanten bisher nicht bestätigt werden. LIU et al. (2001) wiesen in einem kurzen Sequenzabschnitt mit 56 Genen zwischen Reis und *Arabidopsis* eine 39 %ige Konservierung der Genanordnung und -dichte nach. Aber bereits in den genomweiten BLASTX-Analysen von SALSE et al. (2002), basierend auf den verfügbaren Reisgenomsequenzen und der *Arabidopsis* CDS (Coding Sequences)-Datenbank, mußte dieser Wert auf einen maximalen Konservierungsgrad von nur 17 % reduziert werden. Ein entsprechendes Bild ergaben auch die Untersuchungen von DUBCOVSKY et al. (2001) zwischen Gerste, Reis und *Arabidopsis* an Hand von vier Genen aus zwei homologen Reis- (50 kb) und Gerstenregionen (100 kb). Darüber hinaus weist der Reis gegenüber *Arabidopsis* den Vorteil auf, daß er zugleich eine Modellpflanze und eine Kulturpflanze ist.

Heute bietet der Reis zahlreiche genetische und genomische Ressourcen und Instrumente, wozu entwickelte Kopplungskarten mit unterschiedlichen Markersystemen gehören. So sind neben den RFLP-basierten Karten (AHN und TANKSLEY et al. 1993; CAUSSE et al. 1994; HARUSHIMA et al. 1998) auch PCR-basierte Karten mit STS-, CAPS- (YAMAMOTO et al. 1997; <http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/caps/index.html>), oder SSR-Markern (MCCOUCH et al. 2002) verfügbar. Vor allem die EST-basierte 'Nipponbare (*japonica*)' x *Kasalath (indica)*' Kopplungskarte (KURATA et al. 1994; HARUSHIMA et al. 1998) mit aktuell 3.267 Markern (ein Marker alle 190 kb), ist heute eine der dichtesten RFLP-Karten bei Pflanzen. In Verbindung mit der EST-Datenbank (KURATA et al. 1994; YAMAMOTO and SASAKI 1997) stellt diese

Karte u.a. ein wichtiges Instrument für die vergleichende Kartierung dar (GALE und DEVOS 1998).

Daneben können heute genetisch integrierte physische YAC- und BAC- / PAC-Karten als genomische Instrumente eingesetzt werden (Tab. 2). Die genetische Integration der YAC-Klone erfolgte mittels Koloniehybridisierung oder PCR-gestütztem Screening mit ausgewählten genetischen Markern. Dadurch wurden die einzelnen Klone in ihren entsprechenden genetischen Positionen angeordnet und zu Contigs zusammengefügt, die aktuell 80,8 % des Reisgenoms abdecken. Umgekehrt wurden auf diese Weise weitere genetisch nicht lokalisierte Reis-EST-Sonden über ihre physischen YAC-Positionen der Kopplungskarte zugeordnet (KURATA et al. 1997; SAJI et al. 2001; WU et al. 2002).

Das Reisgenom wird gegenwärtig von einem internationalen Konsortium, bestehend aus privat und öffentlich finanzierten Arbeitsgruppen, sequenziert. Neben den Wissenschaftlern der zum internationalen Reis-Genom-Sequenz-Projekt (IRGSP) zusammengeschlossenen öffentlichen Institute, sind auch Wissenschaftler vom privaten Torrey Mesa Research Institut (TMRI) in San Diego (Kalifornien, USA) für den Bio-Konzern Syngenta, sowie von der Universität in Seattle im Auftrag des Unternehmens Monsanto an der Entschlüsselung der Reissorte *Oryza sativa japonica* (cv. Nipponbare) beteiligt. Die Forscher vom Beijing Genomics Institute der Chinesischen Akademie der Wissenschaften sequenzieren die Sorte *Oryza sativa indica* (cv. Kasalath). Sowohl die von privaten Teilnehmer zur Verfügung gestellten sogenannte draft-Sequenzen, als auch die von öffentlichen Teilnehmer des IRGSP erstellten Sequenzen werden vom IRGSP für den Aufbau einer 'Nipponbare'-Genomkarte aufbereitet. Dabei werden die verfügbaren genomischen Klone mittels Fingerprintinganalysen und einer Assembly-Software zu Sequenzcontigs zusammengeschlossen und fehlende Sequenzen ermittelt (ECKARDT 2000; GOFF et al. 2002; YU et al. 2002).

Entsprechend der genomischen YAC-Karte werden zur Zeit auch BAC- / PAC-Klone über computergestützte Sequenzvergleiche und Southern-Hybridisierungen mit zahlreichen EST-

Sonden zu einer genetisch integrierten Klonkarte angeordnet. Die Entwicklung dieser Karte ist noch nicht für alle Chromosomen abgeschlossen, allerdings repräsentieren die verfügbaren BAC- / PAC-Sequenzen bereits 90 % des Reisgenoms (YUAN et al. 2000; CHEN et al. 2002).

Tabelle 2: Charakteristika genomischer Reisbanken

	YAC-Bibliothek	BAC-Bibliothek
Anzahl an Einzelklonen	7.606	73.728
durchschnittliche Insertgröße	350 kb	120 – 150 kb
Genomäquivalent	> 6	> 20
Genomsättigung	80,8 %	95 %
genetisch zugeordnete Klone	2.782	2.056
Anzahl an Contigs	364	458
annotierte Reis-ESTs	6.591	3.199
klonierte Reissorte	'Nipponbare'	'Nipponbare'
Referenz	UMEHARA et al. 1995 SAJI et al. 2001 WU et al. 2002	CHEN et al. 2002

Wie für das Human- und das Arabidopsisgenomprojekt geschehen, wurde auch die Reis-Genomsequenzierung (IRGSP) mit elektronischen Sequenzanalyseprogrammen verbunden. Die so gewonnenen unterschiedlichen biologischen Informationen sind in einer WWW-Datenbank (RiceGAAS) zusammengefaßt und über eine Annotationskarte frei zugänglich (Übersicht: SAKATA et al. 2002, 2000; YUAN et al. 2001). Unter diesen bioinformatischen Ressourcen finden sich u.a. Informationen über vorhergesagte Genloci (ORFs, **O**pen **R**eadin**G** **F**rames) mit zahlreichen BLASTN-, X- und P-Ergebnisse für eine putative Funktionsbestimmung. Tabelle 3 zeigt neben dem japanischen Reisgenomprojekt weitere Datenbanken mit unterschiedlichen Dienstleistungen, die eine Plattform für die effektive Nutzung der Reisressourcen und –instrumente bieten, da sie die unterschiedlichen Informationen miteinander verknüpfen.

Tabelle 3: Sequenzdatenbanken (IRGSP) und Bioinformatik-Dienstleistungen für das Reisgenom

Anbieter	WWW-Adresse (URL)	Dienstleistungen
Gramene: A comparative Mapping Resource for Grains; Cornell University	http://www.gramene.org	Kartendaten, Markerdaten, Links
Clemson University Genomics Institute	http://www.genome.clemson.edu/	BAC-Contig Informationen; BAC-End-Sequenzen; zugeordnete BAC-Klone
Monsanto Rice Genome Project	http://www.rice-research.org	BLAST-Server des IRGSP; SSR-Marker
Rice Genome Program	http://rgp.dna.affrc.go.jp	Kartendaten; Markerdaten; IRGSP-Informationen; genetisch integrierte YAC- und BAC-/ PAC-Karten
TIGR Rice Genome Project	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1	Reisgen-Index; GlimmerM-Reisgen-Identifikation; genetisch integrierte BACs / PACs; via TIGR Genindices annotierte BACs / PACs; RiceEST-Annotator

Traditionell dienten Datenbanken vorrangig als Referenzmaterial, allerdings werden sie in zunehmenden Maße auch als primäres Arbeitsmittel eingesetzt. Denn mit der wachsenden Anzahl verfügbarer Genomsequenzen und Datenbanken, u.a. mit Informationen über artspezifische Sequenzen, Sequenzhomologien, Mutationen und Proteindomänen, erschließen sich heute effektive Informationsquellen. Ergänzt durch spezielle Algorithmen und Softwarepakete für Sequenzanalysen mit unterschiedlichen Zielsetzungen gewinnt die computergestützte Analyse von biologischen Daten auch für die Genisolierung zunehmend an Bedeutung (ALTSCHUL et al. 1997; CARTINHOOR et al. 1997; YUAN et al. 2001; FINKELSTEIN et al. 2002).

2.3.4 Vergleichende RFLP-Kartierung und Genisolierung

Obwohl immer noch viele Fragen im Hinblick auf die Colinearität zwischen unterschiedlichen Gräsern offen sind, steht bereits außer Frage, daß die genomische Mikrocolinearität ein nützliches Instrument für die Isolierung und das Studium von Genen ist. Ein Anwendungsgebiet ist die kartengestützte Klonierung von Genen aus großen Genomen mittels 'chromosome walking' innerhalb einer überschaubaren colinearen Region in einem repräsentativen Genom (DEVOS und GALE 2000). Die Anwendbarkeit dieser Strategie verlangt keine genomweite Colinearität, sondern eine lokale Colinearität in den Segmenten, welche die Zielgene enthalten. Somit kann ein Syntänieansatz auch vor dem Hintergrund der häufigen, aber zumeist nur kleinen chromosomalen Umlagerungen in definierten Genregionen erfolgreich sein. Selbst eine unterbrochene Colinearität kann immer noch eine Quelle für zahlreiche eng flankierende Marker sein, welche die Feinkartierung spärlich gesättigter genetischer Karten unterstützen können (SAGHAI MAROOF et al. 1996; KELLER und FEUILLET 2000). Entsprechendes wurde während der vergleichenden Kartierung des Resistenzgens *Rpg1* auf dem Gerstenchromosom 7H beobachtet, wobei die grundsätzlich konservierte Anordnung integrierter Reismarker durch wenige, nicht colineare Reismarker kontrastiert wurde. Hierbei zeigte sich, daß ein 10 – 15 kb Fragment entweder im Reis oder in der Gerste seine chromosomale Position verändert hatte. Dennoch hatten sich, sowohl die genetische Reiskarte als auch das korrespondierende BAC-Contig als zuverlässige Markerquelle für die Absättigung der *Rpg1* Gerstenregion erwiesen (KILIAN et al. 1995). Die Identifizierung und Analyse entsprechender homologer Regionen in einem kleinen Referenzgenom werden heute durch die verfügbaren Sequenzinformationen und physischen Karten zusätzlich vereinfacht (Arabidopsis: MOZO et al. 1999; Sorghum: DRAYE et al. 2001; Reis: BURR et al. 2002), da sie ein 'chromosome walking' oder 'chromosome landing' auf genomischen Klonen und / oder Contigs über das WWW erlauben (TAO et al. 2001).

Aus der Abwesenheit großer repetitiver DNA-Abschnitte in den kleineren Genomen resultieren zwei wesentlich Vorteile, zunächst einmal das günstigere genetisch - physische Verhältnis, und zweitens die erleichterte Sequenzierung interessanter genomischer Region (DRUKA et al. 2000). Dagegen erweist sich diese Strategie für Pflanzen mit großen Genomen immer noch als sehr kostspielig und bedingt durch den hohen Anteil an repetitiver DNA als technologisch problematisch. Repetitive DNA-Abschnitte führen regelmäßig zu Mehrdeutigkeiten beim Lesen der Sequenzen, wodurch die Fehlerrate erhöht wird und Sequenzlücken entstehen können. Dadurch wird nicht nur die Sequenzierung selbst erschwert, sondern auch der Aufbau von über weite Strecken geschlossenen BAC- / YAC-Contigs (TANKSLEY et al. 1995; CHENG et al. 2001).

Mittlerweile bestätigten unterschiedliche Studien, daß QTLs und Gene für agronomisch wichtige Merkmale wie Vernalisation, Blühzeitpunkt, Pflanzenhöhe, Verzweigung und Ährenbrüchigkeit sich innerhalb der Gräser durchaus in orthologen Positionen befinden (Übersicht: GALE und DEVOS 1998; FREELING 2001). Als ein gutes Beispiel für Orthologie gelten die *GAI* / *RGA* homologen Triticeae-Gene der GA-Signaltransduktion, die sowohl konservierte Sequenzen als auch Loci in homologen chromosomalen Positionen aufweisen (Absch. 2.1.2). Auch für andere GRAS-Signaltransduktionsgene wurden orthologe Beziehungen bestätigt. Hierzu gehört das *Ls* Gen der Tomate, dessen genomische Region eine deutliche Mikrocolinearität mit den orthologen Regionen der Genome von *Arabidopsis* und *Capsella* gezeigt hatte (ROSSBERG et al 2001). Für die *Arabidopsis*-Gene *SCR* und *SPY* konnten ebenfalls Orthologe jeweils im Mais (LIM et al. 2000) und der Gerste (ROBERTSON et al 1998) detektiert werden. Dieser hohe Konservierungsgrad wurde ebenso für Signaltransduktionsgene beobachtet, die beispielsweise an der Auxin- (GUILFOYLE et al. 1998; KOVTUN et al. 1998), Brassinosteroid- (LI and CHORY 1997) oder ABA-Signalkette (FINKELSTEIN et al. 2002; BAILEY et al. 1999) beteiligt sind.

Die gegenteilige Situation mußte allerdings immer wieder für Resistenzgene beobachtet werden, die sich als nicht besonders konserviert erwiesen hatten. Für die Regionen der Gene *Lr1* und *Lr10* auf den Weizenchromosomen 5D und 1A wurde eine mangelnde Colinearität zwischen Weizen und Reis beobachtet. In dieser Studie waren eng flankierende oder cosegregierende Marker aus beiden Genregionen im Reis getestet worden (GALLEGO et al. 1998). Ähnliche Befunde erhielten LEISTER et al. (1998) nach der interspezifischen Kartierung von NBS-LRR-Resistenzgenanalogen aus Reis, Gerste und Hirse. Diese hatten sich entweder als nicht kartierbar erwiesen, wie zwischen Reis und Gerste regelmäßig registriert, oder aber detektierten überwiegend nicht syntäne Kartenpositionen, wie vor allem für die untersuchten Gersten- und Reisproben in der Hirse beobachtet. Auch das Resistenzgen *Rpg1* auf Gerstenchromosom 7H konnte letztlich nicht im 70 kb umspannenden homologen Reis-BAC-Contig nachgewiesen werden (HAN et al. 1999). Diese Daten sind Hinweise darauf, daß die Klonierung von Triticeae-Resistenzgenen über den Syntänieansatz zum Reis, bedingt durch die hohe Mutationsrate dieser Gene, auf wesentlich größere Probleme stößt, als dies beispielsweise für Gene aus Stoffwechsel- oder Signaltransduktionsprozessen der Fall zu sein scheint (LEISTER et al. 1999; DUBCOVSKY et al. 2001).

Dennoch konnten Reismarker häufig erfolgreich für die Absättigung definierter Regionen, auch von Resistenzgenen, in unterschiedlichen Gräsergenomen eingesetzt werden. Für das Gerstengenom können der oben genannten *Rpg1* Region noch die Regionen der Resistenzgene *mlo* (PANSTRUGA et al. 1997), *rpg4* (KILIAN et al. 1997), *Ph*, *Pt*, *rym4* (SMILDE et al. 2001) und *Rph7* (BRUNNER et al. 2000) sowie die Region des photoperiodischen Kontrollgens *Ppd1* (LAURIE 1997; DUNFORD et al. 2002) und die Regionen von zwei QTLs für Brauqualität (HAN et al. 1998) als Beispiele hinzugefügt werden. Im Unterschied zur *Rpg1* Region zeigte die *rpg4* Region auf dem Gerstenchromosom 5H eine hohe Colinearität zwischen Gerste und Reis. Zudem konnte für die genetische *rpg4* Region an Hand

flankierender Ankermarker eine orthologe physische Reisregion identifiziert werden (DRUKA et al. 2000).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Pflanzenmaterial

3.1.1 Aufbau der Population

Die für die Kartierung des *gai* Verzweigungslocus verwendete Wintergerstenpopulation geht auf eine Kreuzung zwischen der verzweigten Pflanze 'Hv287' (Träger der *gai* Mutation, Pollenspender) und der normalwüchsigen Pflanze 'Monte Christo' (Mutter) zurück (Abb. 2). Diese Kreuzung (Populationsnummer 2845) wurde von Dr. Andreas Börner (Abteilung Genbank, Ressourcengenetik und Reproduktion) am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben aufgebaut. Die Selektion der dabei verwendeten Mutante 'Hv287' resultiert aus Arbeiten, die in der genetischen Abteilung des INTA Castelar (Argentina) durchgeführt worden waren. Mittels radioaktiver Bestrahlung der normalwüchsigen Sorte 'M.C. 20 (Mutante de Cebada, d.h. Gerstenmutante)' entstand zunächst die *gai* Zwergmutante 'M.C. 90', die dann nach zweimaliger Rückkreuzung mit der Sorte 'Triumph' als 'Hv287' deklariert wurde (Übersicht: BÖRNER et al. 1999). Der GA-

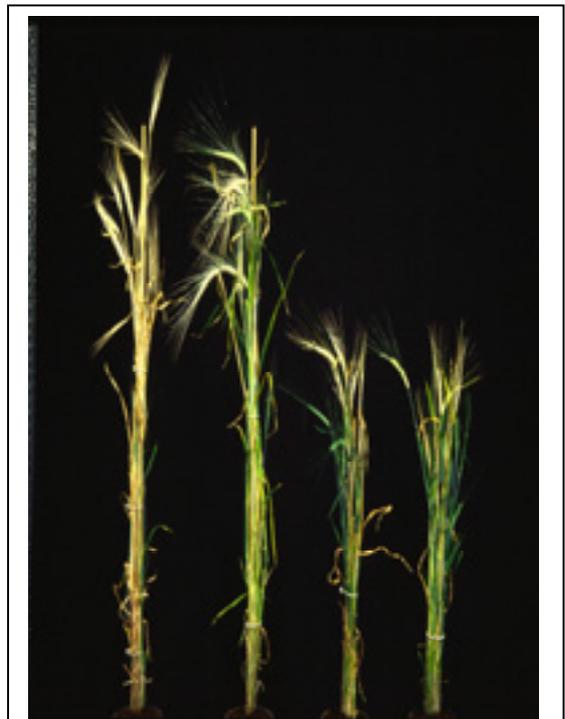


Abbildung 2 : Elternphänotypen der Kartierungspopulation: 2x 'Monte Christo' (links) und 2x 'Hv287' (rechts). Photo mit freundlicher Genehmigung von A. BÖRNER (Theor Appl Genet, 1999)

insensitive Charakter der *gai* Verzweigung konnte bereits von HOPP et al. (1981) an Hand der Mutante 'M.C. 90' nachgewiesen werden. In Testungen der Sämlinge mit exogen appliziertem GA₃ (GA₃-Sämlingstest) wiesen BÖRNER und KORZUN (1995) den monogenen

und rezessiven Charakter der *gai* Mutation nach. Die in dieser Arbeit verwendete Kartierungspopulation geht auf die F₂ Pflanze 2845-1 zurück, die in der ersten Grobkartierung des *gai* Locus mit 108 F₂ Pflanzen im Markerintervall MWG2054 und XIAG68 (12,5 cM) heterozygot war (BÖRNER et al. 1999). Von den 40 F₃ Nachkommen dieser Pflanze wurden die F₄ Samen derjenigen Individuen für den Aufbau der hochauflösenden Kartierungspopulation ausgewählt, die im oben genannten Markerintervall heterozygot waren. Die entsprechenden F₄ Pflanzen wurden in klimatisierten Gewächshäusern angezogen und das frische Blattmaterial für die DNA-Extraktion verwendet. Für die Gewinnung des Saatguts wurden die Ähren vor der Blüte isoliert und nach der Abreife geerntet und gedroschen. Die gezählten Körner wurden anschließend eingetütet und bei 4°C in einem Kühlraum gelagert. Da die ausgewählten heterozygoten F₄ Individuen hinsichtlich des Genlocus wie eine F₂ Population spalten, wird die erstellte Population im folgenden als F₂' deklariert.

Die Zuordnung ausgewählter, in der *gai* Population monomorpher RFLP-Sonden zu spezifischen Gerstenchromosomen bzw. -armen erfolgte über eine Kartierung in den Standardkartierungspopulationen 'Stephoe' x 'Morex' (KLEINHOFs et al. 1993) und 'OWB-dom' x 'OWB-rec' (Oregon Wolfe Barley; P. HAYES (Oregon State University, USA)). Wenn eine genetische Kartierung nicht möglich war, erfolgte die chromosomale Zuordnung mittels der in Tabelle 4 aufgeführten ditelosomen Weizen-Gersten-Additionslinien.

Tabelle 4: Weizen-Gersten-Additionslinien

Bezeichnung	Mutter (Weizen)	Vater (Gerste)	addierte Chromosomen	Referenz
Ditelosome Additionslinien	'Chinese Spring'	'Betzes'	2HS, 2HL, 3HS, 3HL, 4HS, 4HL, 5HS, 5HL, 6HS, 6HL, 7HS, 7HL	ISLAM et al. 1981

3.1.2 GA₃ Sämlingstest

Für die genetische Analyse des *gai* Verzweigungslocus wurden die Pflanzen der Kreuzung 'Monte Christo' x 'Hv287' in einem GA₃-Sämlingstest auf ihre Reaktion gegenüber exogen appliziertem GA₃ getestet. Auf Grund des GA-insensitiven Charakters der *gai* Mutation kann für den 'Hv287' Genotyp keine phänotypische Reaktion auf die GA₃-Applikation beobachtet werden. Wogegen der normalwüchsige Genotyp 'Monte Christo' mit einem Halmwachstum reagiert (Abb. 3). Über eine Testung der F₃' Nachkommenschaft, wurden die F₂' Pflanzen der Kartierungspopulation hinsichtlich ihrer homozygoten (sensitiv / insensitiv) und heterozygoten Genotypen zurückklassifiziert. Die Bonitur der phänotypischen Daten erfolgte gemäß dem von BÖRNER et al. (1987) beschriebenen Testverfahren. Dabei wurden jeweils 15 Sämlinge von jeder F₃' Familie und als Kontrolle jeweils 5 Sämlinge jedes Elters untersucht. Die Einleitung der Samenkeimung erfolgte auf feuchtem Filterpapier für 48 Stunden bei 4°C und völliger Dunkelheit, gefolgt von einer 3tägigen Keimdauer bei 20°C, weiterhin in völliger Dunkelheit. Anschließend wurden die Sämlinge in Kisten mit Einzelkornhalterung übertragen und bei 20°C im Gewächshaus in einer standardisierten Nährlösung mit 5ppm GA₃ kultiviert. Die Bonitur der jeweiligen Wachstumsreaktion erfolgte nach drei Wochen im Dreiblattstadium der Sämlinge. Abbildung 3 zeigt, daß bereits im Zweiblattstadium die charakteristischen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen deutlich hervortreten.



Abbildung 3: F₃'Sämlinge der Kartierungspopulation nach 2 Wochen GA₃ Applikation: 3x 'Monte Christo' (links) und 3x 'Hv287' (rechts)

3.2 Molekulare Marker

3.2.1 Herkunft der RFLP-Sonden

In dieser Arbeit kamen RFLP-Sonden (Tab. A6) aus verschiedenen Herkünften zur Anwendung:

- Die gDNA und cDNA Gerstensonden mit der Bezeichnung MWG und cMWG stammen aus der Kollektion des BAZ Instituts für Resistenzgenetik in Grünbach. Sie waren im Rahmen des Verbundforschungsprojekts "Versuche zur Diagnose wirtschaftlich wichtiger Gene bei Gerste" erstellt worden.
- Daneben wurden Gersten cDNA-Sonden (H; GBR) eingesetzt, die aus der EST (Expressed Sequence Tag)-Kollektion des Pflanzengenom-Ressourcen-Zentrums (PGRC) am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben stammten.
- Die genomische Roggen-Sonde IAG68 wurde im Institut für Angewandte Genetik der Universität Hannover entwickelt.
- Zwei Weizen cDNA-Sonden, BG608073 und BG314153 (*Triticum monococcum*) wurden vom US Departement of Agriculture (Olin Anderson, Agriculture Research Service, Albany, USA) zur Verfügung gestellt.
- Die verwendeten 49 Reis cDNA-Sonden wurden vom 'National Institute of Agrobiological Science' (Takui Sasaki, Genome Research Department, Tsukuba, Japan) und dem Reis-Genom-Programm (RGP, Tsukuba, Japan) bezogen.
- Acht cDNA-Sonden mit den jeweiligen Bezeichnung BCD (Gerste), PSR (Weizen), CSU (Mais), CDO (Hafer), SbRPG (Sorghum) und R (Reis) stammen aus den EGRAM (European Gramineae Mapping Program, EU framework IV) Kollektionen Set1 und Set2, die im Rahmen vergleichender Triticeae-Reis-Kartierungen als Ankermarker zusammengestellt worden waren.

3.2.2 Herkunft der PCR-Primer

Die Bezeichnungen, Nucleotidsequenzen und Schmelztemperaturen der in dieser Arbeit verwendeten und entwickelten Primer sind in den Tabellen A4 und A5 im Anhang aufgeführt.

3.3 DNA-Längenstandards, Enzyme und Basislösungen

Die Fragmentlängenbestimmung in der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mittels folgender Längenstandards der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot): pUC19 DNA / *MspI* (67 – 501 bp), 100 bp Ladder (80 – 1.000 bp), λ -DNA / *HindIII* (125 – 23.130 bp), *EcoRI* / λ -DNA *HindIII* (125 – 21.266 bp) und der 1 kb Ladder (250 – 10.000 bp).

Alle verwendeten Basislösungen (nach SAMBROOK et al. 1998) werden im Anhang beschrieben. Die entsprechenden Chemikalien sind in der Tabelle A1 aufgeführt und die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme sind in der Tabelle A2 aufgelistet.

3.4 Molekulargenetische Analysen

3.4.1 RFLP – Analyse

3.4.1.1 Isolierung genomischer DNA

Die Extraktion der genomischen Gersten-DNA erfolgte nach der Standard-CTAB-Methode von MURRAY und THOMPSON (1980). Für die Extraktion wurde ausschließlich gefriergetrocknetes Blattmaterial verwendet. Hierfür kam eine Vakuumgefrierdrying (Zirbus Apparatebau) zum Einsatz. Die Haupttrocknung erfolgte bei 2,56 mbar (= -10°C) für ca. 48 h, gefolgt von einer Nachdryingperiode von ca. 10 h bei 0,006 mbar (= -15°C). Anschließend wurden die Proben in einer Kugelmühle (Retsch) gemahlen und in 50 ml Falconröhrchen bei Raumtemperatur gelagert. Das Gewicht der Trockenmasse in den Röhrchen lag zwischen 0,3 und 0,5 g. Diese Proben wurden direkt in den Falconröhrchen in 20 ml 1x CTAB / g Trockenmasse gelöst und durchmischt. Nach der Inkubation im Wasserbad bei 65 °C für 1,5 h und der anschließenden Abkühlung auf

Raumtemperatur wurden 0,5 Vol. Chloroform in das Reaktionsgefäß zugegeben und dieses für 15 min in den Überkopfschüttler gestellt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 3500 U / min für 25 min, danach konnte die obere, wäßrige Phase mit den gelösten Nucleinsäuren in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Um eine möglichst reine DNA-Qualität zu erzielen, wurden Chloroformierung und Zentrifugation ohne Änderung wiederholt. Der anschließende Abbau der RNA erfolgte durch die Zugabe von 0,5 mg RNase / g Trockenmasse und einer Inkubation von 20 min bei 37°C im Wasserbad. Für die Fällung der genomischen DNA wurde 0,8 Vol. Isopropanol (-20 °C) zugegeben und die Reaktionsgefäße solange langsam über Kopf gewendet, bis die DNA in sichtbaren Fäden präzipitierte. Diese konnte anschließend mit sterilen Pasteurpipetten gefischt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden. Nach einem Waschschrift in 70 % Ethanol wurde die getrocknete DNA am nächsten Morgen mit TE-Puffer gelöst. Die Qualitätskontrolle der extrahierten DNA erfolgte durch Auftrennung von jeweils 1µl DNA in der Agarose-Gelelektrophorese (0,8 % Agarose). Abschließend wurde die Konzentration durch die Zugabe der entsprechenden Menge TE-Puffer auf ca. 1 µg / µl eingestellt.

3.4.1.2 Restriktionsverdau, Agarose-Gelelektrophorese und Southern-Transfer

Die Zusammensetzung der Restriktionsansätze richtete sich nach den Empfehlungen der Hersteller. In der Regel wurden 3 U Enzym / µg DNA in der Verdauungsreaktion eingesetzt und diese dann für mindestens 5 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in horizontalen Gelelektrophoreseapparaturen, wobei sich die Konzentration der Agarosegele nach den aufzutrennenden Fragmentgrößen richtet und dabei im Bereich zwischen 0,8 und 1,8 % variierte. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Nach der Zugabe von 10x Auftragepuffer wurden die Proben auf das Gel geladen und mit konstanter Spannung von 1 bis 5 V / cm im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Nachweis von DNA-Fragmenten unter UV-Licht ($\lambda=300$ nm) erfolgte entweder durch die

Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) zur Agaroselösung (0,05 µl einer 1%igen Lösung / ml Agarosegel), oder durch nachträgliches Anfärben der Gele im EtBr-Bad (0,5 µl / ml H₂O bist.).

Für den anschließenden Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond-N+, 0,45 µm; Amersham) wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Neben dem alkalischen Übernachttransfer, in Anlehnung an die von SAMBROOK et al. (1989) beschriebene Methode, kam auch die Vakuumblot-Methode zum Einsatz. Für die Vakuum-Methode wurde die Membran zunächst im Zentrum des Vakuublotters (Appligene) positioniert und dann mittels einer Schablone eingefasst. Anschließend mußten beide - Membran und Schablone - mit 0,4 N NaOH angefeuchtet und geglättet werden, um Luftlöcher zu vermeiden. Nach dem Ausrichten des Gels über der Membran und den Seitenrändern der Schablone, konnte der Rahmen der Apparatur aufgelegt und fixiert werden. Danach wurde die Apparatur vorsichtig mit weiterem 0,4 N NaOH aufgefüllt. Der eigentliche DNA-Transfer erfolgte bei einem konstanten Vakuumdruck von 55 – 60 mbar für 1,5 h.

Die pH-Neutralisierung der Membranen erfolgte, unabhängig von der angewendeten Transfermethode, durch Schwenken in 5x SSC. Für abschließende Fixierung wurden die Membranen jeweils zwischen zwei Whatman-Nr.3 Blätter eingelegt, anschließend für 2 h bei 80°C gebacken und danach in einer Frischhaltefolie bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.4.1.3 Plasmidisolierung aus Bakterien

Mittels Minipräparationen wurde die Plasmid-DNA für die RFLP-Sondenpräparation isoliert. Für die Anzucht der Bakterien (*E.coli* DH 5α) wurden einzelne Stämme zunächst auf einem LB-Selektiv-Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin ausgestrichen und für 14 –16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Beimpfung der 5 ml LB-Übernacht-Kulturen, jeweils mit einer als Plasmidträger selektierten

Bakterienkolonie. Nach der Kultivierung bei 37°C wurden 1,5 ml dieser Flüssigkultur zweimal hintereinander abzentrifugiert (für 30 sec, 13.000 rpm) und der flüssige Überstand zwischendurch abgegossen. Abschließend konnte der restliche Überstand vorsichtig abgesaugt werden. Das zurückbleibende Bakterienpellet wurde mit 50 µl ASMP I Lösung (+ 2 µl RNase A (10mg / ml)) resuspendiert. Die Lyse der Zellwände erfolgte durch das Einfüllen von 100 µl frisch zubereiteten Lysepuffer, gefolgt von einer Lagerung für 5 min auf Eis. Die Zugabe von 75 µl ASMP III stoppte die Lyse wieder, dabei lagerte der Ansatz für 10 min auf Eis und mußte anschließend abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm) werden (Die Zusammensetzungen von ASMP I und III werden im Anhang angegeben). Für die Fällung der Plasmid-DNA wurde der abpipettierte Überstand (max. 180 µl) mit absolut Ethanol auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm). Der abschließende Waschschrift beinhaltet eine Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol und eine erneute Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm). Das getrocknete Pellet wurde schließlich in 30 µl TE-Puffer gelöst.

In der Plasmidisolierung für Sequenzierungsreaktionen kam der 'Qiagen Plasmid Mini Kit' entsprechend dem beigelegten Protokoll zum Einsatz, da hierbei besondere Anforderungen an die Plasmidqualität gestellt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte jeweils durch gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmide in einem 1,0 %igen Agarosegel, zusammen mit dem Marker λ -HindIII als Molekulargewichtsstandard.

3.4.1.4 Sondenpräparation und radioaktive Markierung

Für die Herstellung der DNA-Sonden wurden die Insertionen der Plasmide auf zwei unterschiedlichen Wegen gewonnen. Entweder wurde das Fragment durch einen Restriktionsverdau, mit dem für die Klonierung des Fragments verwendeten Enzym (i.d.R. *PstI* oder *EcoRI*), herausgeschnitten, oder mittels der Universal-M13-Primer herausamplifiziert. Je nach Insertgröße erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem

0,8 – 1,2 %igen Agarosegel. Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und unter Verwendung des 'Qiaquick Gel Extraction Kit' nach Protokollangaben in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Konzentrationseinstellung für die radioaktive Markierung erfolgte durch Verdünnung mit TE-Puffer auf 1 – 2 ng / µl.

Die radioaktive Markierung der Sonden mit [α -³²]dCTP folgte methodisch dem 'random-prime' Verfahren nach FEINBERG und VOGELSTEIN (1983). Dabei wurde mit einem Random-Prime-Kit entsprechend den Herstellerangaben (Amersham) verfahren. In der Regel reichte jedoch ein Viertel der vom Hersteller empfohlenen Menge (d.h. 12,5 ng anstelle von 50 ng DNA) für eine ausreichend spezifische Aktivität der Sonde. Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend diente eine (mit Glaswolle abgedichtete 1000 µl Pipettenspitze) Sephadex-Säule für die Abtrennung der nicht eingebauten Nucleotide. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte durch Messung eines Aliquots im Szintillationszähler (wallac WINSPECTRAL).

3.4.1.5 DNA-Hybridisierung homologer und heterologer DNA-Sonden

Um unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen abzusättigen, wurden diese in Plastikschaalen für zwei bis drei Stunden, je nach Größe, in 10 – 25 ml Hybridisierungslösung unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte in Glasröhren in einem Drehinkubator (Heidolph REAX2, Schütt Labortechnik, Göttingen) bei 65°C über Nacht. Bis zu sechs Membranen (jeweils maximal 15 x 20 cm groß) und bis zu drei Membranen (jeweils maximal 20 x 25 cm groß) wurden, möglichst ohne Luftblasen zu bilden, an der Glaswand der Röhren aufgerollt. Das Volumen der Hybridisierungslösung wurde so gewählt, daß nach der Zugabe der radioaktiv markierten, denaturierten Sonde die spezifische Aktivität 1 bis 2×10^6 cpm / ml betrug. Als Längenstandard diente radioaktiv markierte λ -HindIII-DNA mit einer spezifischen Aktivität von 1×10^3 cpm / ml Hybridisierungslösung.

Um die unspezifisch gebundenen DNA-Fragmente zu entfernen, wurden für homologe und heterologe Sonden unterschiedliche Protokolle verfolgt. Der Hybridisierung homologer Sonden folgte zunächst ein zweimaliges Waschen der Membranen in der Waschlösung I bei 65°C, im ersten Schritt für 30 min und im zweiten Schritt für 15 min. Entsprechend der jeweils vorgefundenen Restaktivität kamen ein bis zwei Waschschrte in der Waschlösung II hinzu, jeweils für 15 min bei 65°C. Für heterologe Reis-Sonden wurden die Membranen unter weniger stringenten Bedingungen gewaschen. Diese Modifikationen umfaßten sowohl Dauer und Temperatur der Waschschrte, als auch die Konzentrationen der beiden Reis-Waschlösungen I und II. Unmittelbar nach der Hybridisierung wurden drei Waschschrte in der Reis-Waschlösung I für jeweils 5 - 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt, gefolgt von maximal zwei weiteren Schritten in der Reis-Waschlösung II, bei 55°C für jeweils 10 min. Sowohl vor, als auch zwischen den Waschschrten mit Lösung II wurde jeweils die Restaktivität der Membranen überprüft, um ein Abwaschen schwach gebundener Reis-DNA zu verhindern. Die Zusammensetzungen der verwendeten Waschlösungen werden im Anhang aufgeführt.

Nach dem Waschen wurden die noch feuchten Membranen in Klarsichtfolie eingeschlagen und gemeinsam mit einem Röntgenfilm (FUJIFILM) in BioMAX-Kassetten mit Verstärkerfolie (Kodak; Rochester) für 1 – 3 Tage exponiert. Anschließend wurde der Film in den FUJIFILM Imager (FLA-3000) eingelesen und das Bild abgespeichert.

Zur Wiederverwendung der Membranen wurden diese für 5 min in kochendem H₂O mit 0,1 % SDS / l gewaschen, um die gebundenen DNA-Fragmente zu lösen. Zwischen zwei Whatman-Nr.3 Blättern eingefaßt konnten die Membranen anschließend für 30 min bei 80°C gebacken und danach in einer Klarsichtfolie erneut bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Die so behandelten Membranen ließen sich bis zu 15 mal wiederverwenden.

3.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (SAIKI et al. 1988) kam in dieser Arbeit für unterschiedliche Anwendungen zum Einsatz. Dazu zählten die Insertamplifikation in der RFLP-Technik, sowie die Entwicklung von STS (Sequence Tagged Site)- und SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Markern.

Die genomische Ziel-DNA wurde nach der in Abschnitt 3.4.1.1 beschriebenen Methode von MURRAY und THOMPSON (1980) extrahiert. Die Reaktionen erfolgte in Volumen von 20 µl bzw. 50 µl, mit jeweils 5 ng / µl Plasmid-DNA oder 25 ng / µl gDNA als Matrize. In Tabelle 5 sind die einzelnen Reaktionsansätze der drei Anwendungsbereiche bezogen auf ein 20 µl Volumen aufgeführt. Die entsprechenden Standardamplifikationsbedingungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionsansätze (20 µl) für die PCR

Anwendung	Puffer 10x	dNTP-Mix 2mM	Primer jew. 5µM	Taq-Polymerase 5 U / µl	Reaktions- bedingungen
Insertamplifikation	1x	100 µM	0,25 µM	1 U	1
STS-PCR	s.o.	s.o.	0,5 µM	s.o.	2
SNP-Analyse	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	3

Nach Ablauf der Reaktion wurden aus den Ansätzen jeweils 10 µl Aliquots entnommen und zur Auftrennung der PCR-Produkte auf ein 1 – 1,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Auswertung der Banden erfolgte durch Photographieren des Gels unter UV-Licht ($\lambda=300$ nm).

3.4.3 SNP- und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde in dieser Arbeit für die Suche nach möglichen Punktmutationen (SNPs) zwischen den Kartierungseltern eingesetzt. Untersucht wurden

Tabelle 6: Amplifikationsbedingungen für die PCR-Reaktionen

PCR-Profil	Reaktionsbedingungen		
	1	2	3
Startdenaturierung	3 min, 94°C	3 min, 94°C	3 min, 94°C
Denaturierung	30 sec, 94°C	1 min, 94°C	1 min, 94°C
Primeranlagerung	30 sec, 50°C	1 min, T _a ¹⁾	1 min, T _a ¹⁾
Extension	30 sec, 72°C	2 min, 72°C	2 min, 72°C
Zyklenzahl	35	7	35
	-	1 min, 94°C	-
	-	1 min, T _a - 4°C	-
	-	2 min, 72°C	-
	-	30	-
Finale Extension	10 min, 72°C	10 min, 72°C	10 min, 72°C

¹⁾ Für Primeranlagerung wurde eine T_a gewählt, die 3 - 5°C unter dem berechneten T_m liegt und gegebenenfalls als Ausgangspunkt für eine spätere Optimierungen benutzt. Die jeweiligen T_m- Werte können den Tabellen A4 - A5 im Anhang entnommen werden.

hierbei die fünf Gersten-ESTs, GBR0586, GBR0334, GBR0840, GBR0336 und GBR0335 und der zum STS-Marker konvertierte RFLP-Marker MWG2287. Die Gewinnung der DNA für die Sequenzierung erfolgte über PCR-Amplifikationen aus den 'Hv287' und 'Monte Christo' Genotypen. Die spezifischen Primer (Tab. A4) wurden mittels der Primer 0.5 Software entwickelt. Wo dies möglich war, wurden die 3' und 5' Sequenzen der ESTs zuvor zu einem Contig verbunden. Für die spätere Überprüfung der Sequenzdaten wurden für jede untersuchte Sonde vier PCR-Ansätzen zusammengestellt, bestehend aus der genomischen Eltern-DNA und jeweils zwei unabhängigen Wiederholungen. Die beobachteten PCR-Fragmente wurden mittels ditelosomer Weizen-Gersten-Additionslinien hinsichtlich der geforderten chromosomalen Position auf 2HS überprüft. Die Präparation von ausreichend reiner DNA für die Sequenzierung wurde bei Einzelfragmenten mit dem 'QIAquick PCR Purification Kit' durchgeführt. Lagen mehrere PCR-Fragmente vor, wurden diese jeweils einzeln aus dem Gel isoliert mit Hilfe eines 'Qiaquick Gel Extraction Kit' aufgereinigt.

Die entsprechenden PCR-Produkte wurden nach dem von SANGER et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotidverfahren sequenziert. Für die Vorbereitung der Sequenzierreaktion kam der BigDye™ Terminator Sequenzierkit der Firma Perkin-Elmer (USA) zum Einsatz, dabei lag die durchschnittliche DNA-Konzentration der PCR-Produkte bei 100 - 200 ng. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die eigentliche Sequenzierung wurde vom Sequenzierservice des Instituts an einem ABIPrism 377XL (Perkin-Elmer) DNA Sequenziergerät durchgeführt.

Die Suche nach Punktmutationen zwischen 'Hv287' und 'Monte Christo' wurde mit Hilfe der Software Sequencher™ 3.0 (Gene Codes Corporation, USA) durchgeführt. Die entsprechenden Sequenzen wurden manuell auf Polymorphismen zwischen den Eltern untersucht. Als Qualitätskontrolle wurde eine Consensussequenz erstellt, bestehend aus den zwei Wiederholungen für jede Elternsequenz. Spezifität, Sensitivität und Einsatzfähigkeit der entwickelten SNP-Marker wurden entsprechend dem von KOTA et al. (2001) beschriebenen und am IPK etablierten DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)-Verfahren überprüft.

Tabelle 7: PCR-Reaktionsansatz (10 µl) und Amplifikationsbedingungen für die Sequenzierreaktionen

Reaktionsansatz		Amplifikationsbedingungen		
	Menge		Temperatur	Zeit
dsDNA	≤ 6 µl	Startdenaturierung	95°C	5 min
Primer (5 µM)	1.0 µl	Denaturierung	95°C	30 sec
BigDye Premix	4 µl	Primeranlagerung	T _a ¹⁾	20 sec
		Extension	60 °C	4 min
		Zyklenzahl		40

¹⁾ Der T_a-Wert für die Sequenzierreaktion entspricht dem in der PCR-Reaktion optimierten T_a-Wert.

3.5 Datenanalyse

3.5.1 Bulked Segregant Analysis

Die Analyse isogener DNA-Pools oder **Bulked Segregant Analysis (BSA)** nach MICHELMORE et al. (1991) und GIOVANNONI et al. (1991) ermöglicht eine schnelle Identifizierung von Markern, die mit bestimmten Genen und / oder Markergruppen gekoppelt sind.

Basierend auf den in dieser Arbeit erstellten genetischen Karten der *gai* Region wurden die Poolindividuen jeweils an Hand der Segregationsdaten in den genetischen Intervallen zwischen MWG2058 – cMWG658 (6,2 cM; niedrigauflösend) und MWG2287 – cMWG658 (4,3 cM; hochauflösend) ausgewählt und entsprechend ihrer beobachteten Genotypen als homozygot für einen der beiden Eltern klassifiziert (Abb. 4).

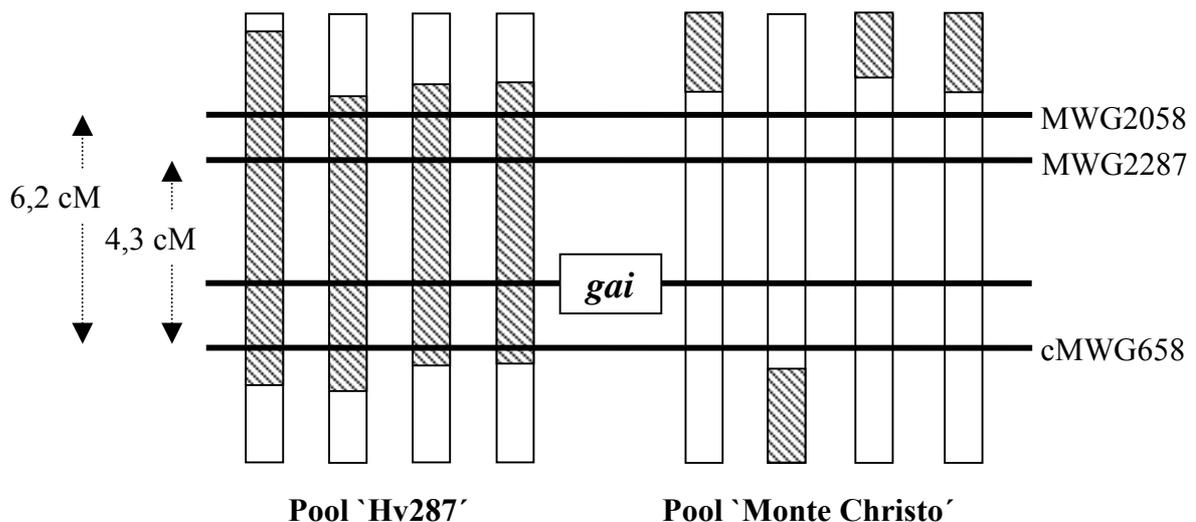


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bulk Segregant Analysis (nach GIOVANNONI et al. 1991)

Die senkrechten Balken repräsentieren mittels RFLP-Analyse selektierte, im Zielintervall homozygote Pool-Individuen der untersuchten Kreuzungseltern. Verschiedene Schattierungen zeigen die unterschiedlichen Genomregionen der beiden Eltern an. Die waagerechten Linien repräsentieren die Grenzen der untersuchten Markerintervalle und den Genlocus.

Auf dieser Grundlage erfolgte die Bildung von zwei isogenen DNA-Pools (= bulks) aus jeweils 11 F₂' Pflanzen, die in der Zielregion entweder den 'Hv287' oder den 'Monte Christo' Genotyp repräsentierten. Zusätzlich wurden 11 heterozygote Genotypen gepoolt. Das gewählte Verhältnis von Intervall- und Poolgröße richtete sich nach den von GIOVANNONI et al. (1991) durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Doppel-Crossover-Ereignissen im Zielintervall und 'falsch-positiven' Markerkandidaten. Dabei sollte die Zuverlässigkeit der zusammengestellten Pools auch mit zunehmender Markerdichte im genetischen Intervall steigen. Alle drei Pools wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *DraI*, *BamHI* und *XbaI* (Tab. A2) geschnitten und auf BSA-Membranen für das Poolscreening zusammengestellt.

3.5.2 Kopplungsdatenanalyse

Für die RFLP-Analyse der F₂' Kartierungspopulation kamen zwei verschiedene Typen von DNA-Filtern zum Einsatz:

- Pool-Filter für die BSA mit drei DNA-Pools, die jeweils die Genotypen der beiden Eltern und der Heterozygoten repräsentieren. Alle drei Pools waren mit den sechs Enzymen *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *DraI*, *BamHI* und *XbaI* restringiert worden.
- F₂'-Filter für die genetische Analyse der Population, welche die DNA von 200 Pflanzen der niedrigauflösenden Population oder von rekombinanten Pflanzen der hochauflösenden Population enthielten, jeweils mit einem der sechs Enzyme restringiert; sowie die Filter für das Rekombinanten-Screening mit der DNA von 767 Pflanzen, jeweils mit dem Enzym *BamHI* geschnitten.

Die Pool-Filter dienten der Identifikation polymorpher Sonden für die definierte Zielregion. Bei codominanten Markern wurde die An- und Abwesenheit eines allelischen Fragmentes entweder als 'A' für den Elter 'Monte Christo' oder als 'B' für den Elter 'Hv287' dokumentiert. Heterozygote Genotypen wurden dabei mit 'H' und nicht klar erkennbare

Genotypen mit '-' (missing data) bezeichnet. Bei dominanten Markern wurde hingegen die erkennbare elterliche Allelkonformation entsprechend dokumentiert (A oder B) und die heterozygote bzw. die von dieser nicht eindeutig unterscheidbare Konformation des anderen Elters mit 'C' oder 'D' codiert. Die entsprechenden Daten wurden unmittelbar im Programm MAPMANAGER QTX13 (MANLY 1993) zusammengefaßt und verwaltet.

Die Untersuchung der Segregationsdaten auf Abweichungen von den erwarteten Spaltungsverhältnissen (1 : 2 : 1, 3 : 1) erfolgte mittels dem χ^2 -Test nach MATHER (1938). Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ zugrunde gelegt. Weicht dabei die beobachtete Verteilung der Genotypklassen signifikant von der erwarteten Verteilung ab, muß bei gegebenen P eine gestörte Segregation des Markers angenommen werden.

Für die Berechnung der Kopplungsgruppe und der Markerreihenfolge kam die JoinMap® 3.0 Software (VAN OOIJEN und VOORRIPS 2001) zum Einsatz. Die Segregationsdaten wurden zuvor im Programm MAPMANAGER in eine für JoinMap® erforderliche Form transformiert und als 'F₂ intercross data' klassifiziert. Die Berechnung der Kopplungsgruppe und Markerreihenfolge basiert auf der Maximum-Likelihood-Methode (FISCHER und BALMUKAND 1928) für die Schätzung genetischer Distanzen zwischen Markern. In der Zweipunktkopplungsanalyse werden über die Maximum-Likelihood-Methode die Rekombinationswerte für alle möglichen Kombinationen von Markerpaaren ermittelt. Die aus den jeweiligen Rekombinationswerten abgeleiteten LOD-Werte dienen als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zwischen zwei Markern. Hierbei wurden als Grundeinstellung eine Rekombinationsschwelle (max. Rekombinationsfrequenz zwischen zwei Markern) von 0,4 (40 %) und ein LOD-Wert von 3,0 (min. Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung) festgelegt. Die Ermittlung der wahrscheinlichsten linearen Markeranordnung erfolgt über die Berechnung von Maximum-Likelihood-Karten auf der Grundlage kalkulierter Kartendistanzen und relativer *log-likelihood*-Werte für alle möglichen Markerreihenfolgen. Dabei wird die wahrscheinlichste Anordnung durch einen relativen *log-likelihood*-Wert von

0,0 angezeigt. Nach der Festlegung einer Kopplungsgruppe werden die Rekombinationswerte zwischen den Markern bestimmt und nach der Transformationsfunktion von KOSAMBI (1944) in lineare cM Einheiten umgerechnet. Die Benutzung der Software erfolgte entsprechend den Angaben und Möglichkeiten, wie sie im Handbuch (JoinMap® 3.0 Manual, VAN OOIJEN und VOORRIPS (2001)) beschrieben werden.

3.5.3 Strategie der Markerselektion für die vergleichende Kartierung

Die in Abbildung 5 dargestellte Strategie der Markerselektion für die *gai* Region der Gerste basiert auf der Syntänie zu einer definierten Region im Reisgenom und bewegte sich auf zwei Ebenen, der genetischen und der genetisch-physischen Ebene.

Auf der genetischen Ebene wurden über die vergleichende Kartierung syntäne Marker aus der Reisregion als Kandidaten für die Zielregion in der Gerste vorselektiert. Hierzu wurde die gesättigte 'Nipponbare' x 'Kasalath' EST-Kopplungskarte des RGP (HARUSHIMA et al. 1998) als Markerquelle genutzt. Die Integration colinearer Reis-EST-Marker in die Gerstenkarte schaffte die Ausgangsposition für den Übergang auf die genetisch-physische Ebene, wo über die Identifikation der korrespondierenden genomischen Reisregion neue Markerquellen erschlossen wurden. Hierzu wurde einmal die elektronisch verfügbare, genetisch integrierte YAC-Karte (Übersicht: WU et al. 2002; SAJI et al. 2001) des RGP genutzt. Diese Karte weist insgesamt 2.782 YAC-Klone auf, die in 364 Contigs angeordnet sind. Insgesamt waren 6.591 Reis-EST-Sonden auf den einzelnen YAC-Klonen lokalisiert worden. Davon stammen 1.439 Marker aus der RGP-Kopplungskarte, die übrigen sind ausschließlich YAC-lokalisierte Sonden, diese konnten als weitere Markerquelle dienen.

Als zweite Reis-Ressource wurde die BAC- / PAC-Sequenzdatenbank des RGP genutzt. Ausgangspunkt des Screenings waren diejenigen Klone, die über Sequenzhomologien mit Reis-EST-Markern ihren jeweiligen genetischen Positionen in der RGP-Kopplungskarte zugeordnet worden waren (Tab. 8). Die DNA-Sequenzen des BAC- / PAC-Contigs wurden

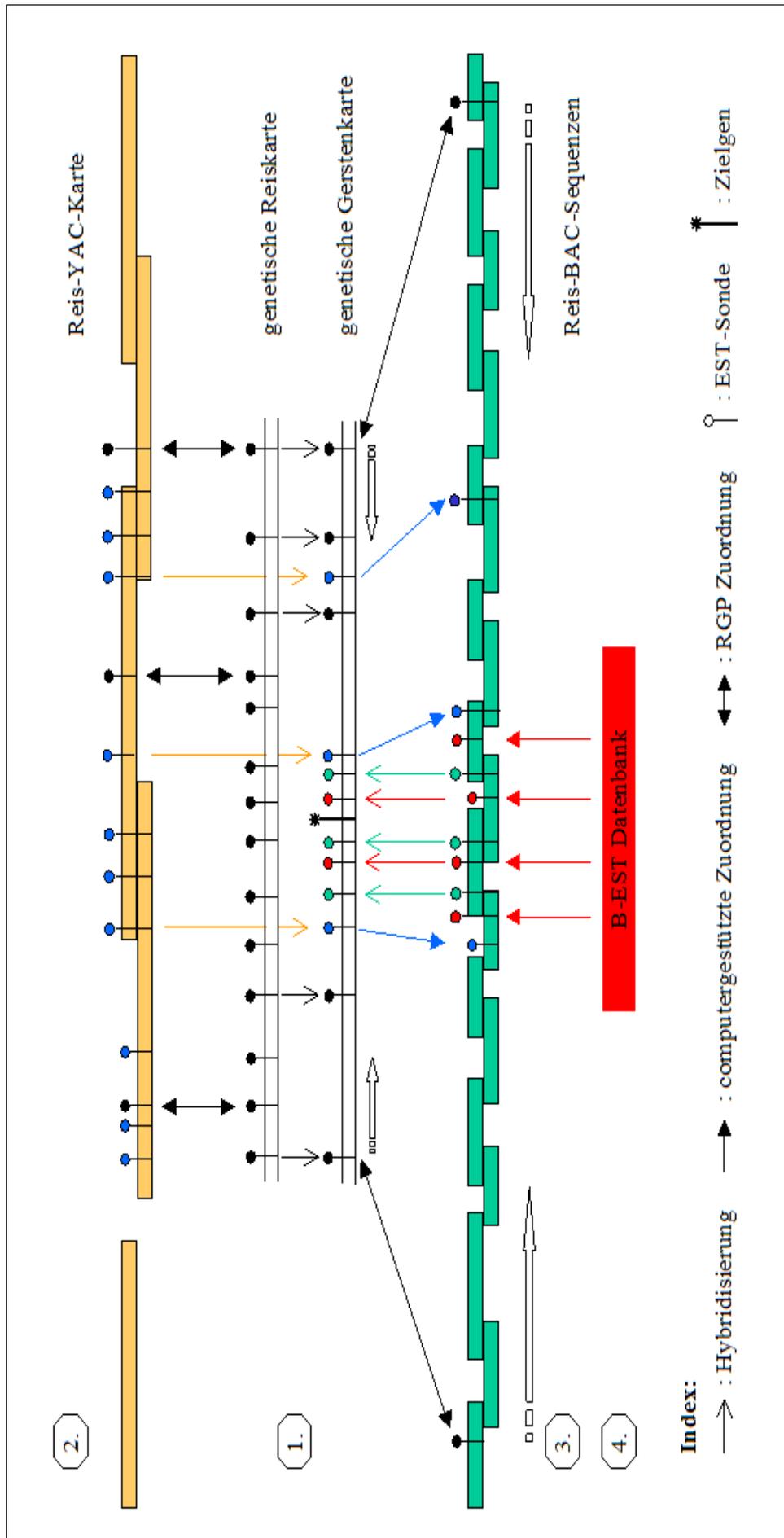


Abbildung 5: Schematische Darstellung der um den Syntänieansatz und das computergestützte Markerscreening erweiterten 'Gene Golfing' Strategie nach ZHANG und WING (1997). In mehreren wechselseitigen 'chromosome und genetic walking' Schritten soll die genetische Zielregion in der Gerstenkarte jeweils weiter verringert werden (1. – 4.). (1.) Ausgangspunkt sind colineare Markerkarten in der untersuchten Genomregion, gefolgt von der markergestützten Identifikation homologer YAC- (2.) und BAC-Klone (3.) aus dem Reis (Tab. 8). Diese fungieren als weitere Markerquellen für ein 'genetic walking' in der genetischen Gerstenkarte und für ein computergestütztes 'chromosome walking' in der identifizierten BAC-Region. (4.) Die Zuordnung von Gersten-ESTs (Tab. 9) zu den Sequenzen der BAC-Zielregion stellt zusätzliche Sonden für die Absättigung der genetischen Zielregion bereit. Die unterschiedlich gefärbten Köpfe der einzelnen EST-Symbole bezeichnen die jeweilige Quelle der integrierten Sonden.

zur Identifizierung homologer ESTs aus der IPK B-EST-Datenbank (Tab. 9; MICHALEK et al. 2002) herangezogen.

Im Kern basierte die in dieser Arbeit eingesetzte Strategie auf einem Verfahren zur Genisolierung und Feinkartierung, das von ZHANG und WING (1997) als "Gene golfing" bezeichnet wurde. Diese Strategie setzt grundsätzlich die Verfügbarkeit physischer Karten voraus, um möglichst schnell von der genetischen auf die physische Ebene wechseln zu können. Die Analogie zu einem Golfspiel entsteht durch die wechselseitig ausgeführten genetischen und physischen Kartierungsschritte (Golfschläge), wobei die physische Karte zunächst bei jedem Schritt als Markerquelle dient. Dadurch nähert man sich successive auf beiden Systemen dem Ziellocus, solange bis die Zielregionen auf überschaubare cM und kb Distanzen reduziert ist.

Für die Markerselektion in der *gai* Region wurde diese Strategie dahingehend erweitert, daß alle durchgeführten 'chromosome landing' (YAC-Contig) und 'chromosome walking' (BAC-Contig) Schritte im Reis, basierend auf den verfügbaren genomischen Ressourcen und der beobachteten Colinearität, computergestützt durchgeführt wurden.

Tabelle 8: Genetisch und physisch lokalisierte Reis-ESTs des RGP (2001)

		EST-Klone
Kopplungskarte	kartierte ESTs	1.455
	kartierte ESTs mit signifikanten Homologien zu bekannten Genen	615
genetisch integrierte physische Karten	BAC konjugierte ESTs	3.199
	YAC konjugierte ESTs	6.591
	Ø EST-Dichte der YAC-Karte	1,9 ESTs / 100 kb
	min. EST-Dichte (Zentromerregionen)	0 – 1 EST / 100 kb
	max. EST-Dichte (Chromosom 8)	5,4 ESTs / 100 kb
Sequenzdaten	Ø Gendichte (vorhergesagte Gene)	17,8 Gene / 100 kb

Tabelle 9: Verfügbare Gersten-ESTs der B-EST-Datenbank (Vers 2.1)

cDNA-Klone		89.466
	Einzelklone (nach 'clone linking')	9.551
ESTs (3' und 5' Sequenzen)		110.981
	Einzel-ESTs	11.036
EST-Cluster		10.335
	Klone	79.855
	ESTs	99.945
erwartete Unigene ¹⁾		19.886

¹⁾ Anzahl der Einzelklone + Anzahl der EST-Cluster

3.5.4 Sequenzanalysen

3.5.4.1 Screening von Nucleotid- und Proteinsequenzdatenbanken

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Analysen auf Sequenzhomologien wurden mittels der jeweiligen BLASTN- / X- / P- und N2-Algorithmen durchgeführt (ALTSCHUL et al. 1990; ALTSCHUL et al. 1997). Für die Bewertung der Ergebnisse dieser Analysen wurden die von MICHALEK et al. (1999, 2002) beschriebenen Kriterien zu Grunde gelegt. Wobei eine Homologie als signifikant ('Hit') interpretiert wurde, wenn der ermittelte e -Wert bei $\leq 1e^{-20}$ lag. Als schwache Ähnlichkeit wurden e -Werte zwischen $1e^{-5}$ und $1e^{-10}$, und als vorhandene Ähnlichkeit wurden Werte zwischen $1e^{-11}$ und $1e^{-19}$ interpretiert. Zusätzlich wurden für die Bewertung von BLASTN-Ergebnissen Länge und Geschlossenheit der gefunden Sequenzangleichungen ('Identities') berücksichtigt. Dabei stellten ≥ 70 % Sequenzidentität in einem geschlossenen Sequenzabschnitt von mindestens 100 Nucleotiden die geforderte Untergrenze für eine Homologie zwischen zwei Sequenzen dar. In den Analysen wurde der vorgegebene 'Expect' Parameterwert $E = 10$ als Signifikanzschwelle für die ausgegebenen BLAST-Ergebnisse gewählt.

Die erforderlichen Sequenzalignments für einen Vergleich ausgewählter Reis-, Gersten- und Weizen-ESTs, für die Zuordnung von ESTs zu Reis-BAC- / PAC-Sequenzen (computergestütztes 'chromosome walking') und für die Identifikation von überlappenden

BAC- / PAC-Endsequenzen erfolgten mittels dem auf der NCBI-Homepage zur Verfügung gestellten BLASTN2-Programms (National Centre for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Homologieanalysen für die Identifikation von ESTs und charakterisierten Proteinen wurden in der NCBI-Datenbank (Übersicht: BENSON et al. 2002) mittels BLASTN- / X- /P-Algorithmen (db-EST-Sequenzen; nr Proteinsequenzen) durchgeführt. Für die Bewertung von BLASTX-Homologien wurden alle Parameter gleichermaßen berücksichtigt. Dabei wurde bedacht, daß neben dem ermittelten *e*-Wert die Länge der beobachteten Sequenzangleichungen bei $\geq 48\%$ ('Identities') liegen sollte, um bereits an dieser Stelle zwischen Proteinen zu unterscheiden, die entweder in großen Sequenzabschnitten, oder nur in kurzen Sequenzmotiven signifikante Ähnlichkeiten mit den untersuchten Reisssequenzen aufweisen (SALSE et al. 2002).

Daneben wurden im Rahmen der verwendeten Strategie für die Markerselektion EST-Screenings in der B-EST-Datenbank am IPK (<http://www.ipk-gatersleben.de>) und der MAFF (Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)-EST-Datenbank (RGP Homepage: <http://rgp.dna.affrc.go.jp/Publicdata.html>) durchgeführt. Die Analyse der genomischen Zielregion im Reis hinsichtlich potentieller Kandidatengene und präsenster Reis-ESTs erfolgte über Daten aus der automatisierten Sequenzstrukturanalyse RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation System, <http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp>, (YUAN et al. 2000; CHEN et al. 2002) des RGP. Für genomweite Analysen fand die Genomsequenzdatenbank des TIGR-Reisgenomprojektes (<http://www.tigr.org/tdb/rice>) Verwendung.

3.5.4.2 Instrumente der Proteinsequenzanalyse

Für einen Vergleich von vorhergesagten Proteinsequenzen aus dem Reis und ausgewählten, funktionell charakterisierten Proteinen von Signaltransduktionsgenen der GRAS-Familie kamen die 'PIMA' Sequenzalignment-Software (SMITH und SMITH 1990,

1992) und die 'BLOCKMAKER' Software (HENIKOFF et al. 1995) zum Einsatz. Dabei werden mehrere Sequenzen bruchstückhaft angeordnet, so daß die konservierten Sequenzregionen zueinander ausgerichtet werden können. Diese dienen als Maßstab für eine Kalkulation der wechselseitigen Ähnlichkeitswerte, die durch einen Verwandtschaftsbaum (phylogenetische Klassifikation) aus eng bzw. entfernt verwandten Proteinen repräsentiert werden (CLUSTAL W Software vers 1.30; THOMPSON et al. 1994). Zusätzlich wurden die so ermittelten konservierten Regionen der untersuchten Proteine manuell hinsichtlich der An- oder Abwesenheit von spezifischen Domänen und Sequenzmotiven analysiert (Abb. A1), um eine genauere Charakterisierung der vorhergesagten Proteinsequenzen aus dem Reis zu erhalten und um mögliche 'falsch-positiv' Homologien auszuschließen.

4 ERGEBNISSE

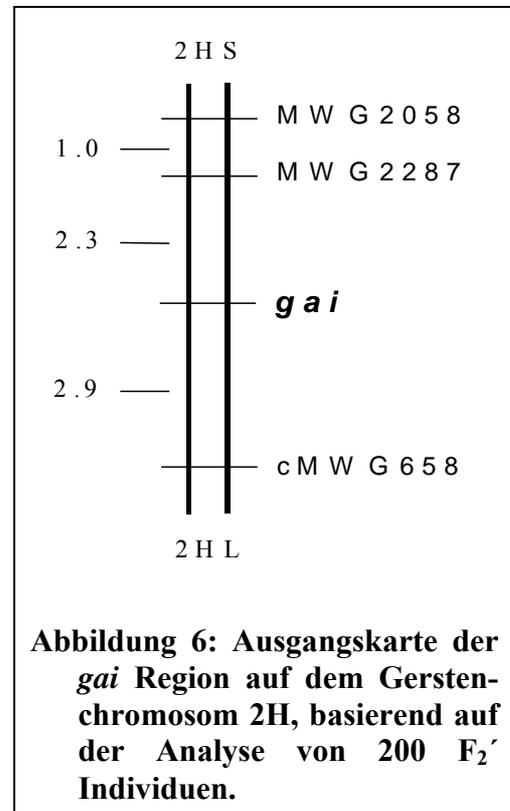
4.1 Aufbau der genetisch hochauflösenden F₂'-Population

4.1.1 Identifikation heterozygoter Ausgangspflanzen

Basierend auf den bereits verfügbaren Informationen aus der Lokalisierung des *gai* Verzweigungsgens auf dem Gerstenchromosom 2HS (FAVRET et al. 1975) und aus der Grobkartierung der *gai* Region mit sechs gekoppelten RFLP-Markern (BÖRNER et al. 1999), sollte für die Feinkartierung dieser Region eine hochauflösende 'Hv287' x 'Monte Christo' Kartierungspopulation aufgebaut werden. Um Zeit zu sparen, wurde die Ausgangskreuzung nicht wiederholt, sondern es wurde auf Pflanzenmaterial zurückgegriffen das aus der von Dr. A. Börner erstellten F₂ Population (108 Individuen) stammte. Als Ausgangspunkt für den Aufbau der hochauflösenden Kartierungspopulation standen somit die DNA von 40 F₃ Pflanzen und das entsprechende F₄ Saatgut zur Verfügung. Zunächst wurden aus diesen 40 Ausgangspflanzen jene Individuen identifiziert, die in der *gai* Region heterozygot waren. Dieses Screening erfolgte mittels einer RFLP-Analyse von sechs Markern aus der Zielregion: MWG557, MWG2287, MWG2054, MWG2058, cMWG658 und XIAG68 (BÖRNER et al. 1999). Im GA₃-Sämlingstest wurde die Reaktion der untersuchten Pflanzen gegenüber exogen appliziertem GA₃ ermittelt. Dabei wurden insgesamt 15 Pflanzen, im beobachteten 15,6 cM Intervall MWG2054 - XIAG68, als heterozygote Genotypen nachgewiesen. Aus diesen zu F₁ Hybriden äquivalenten Pflanzen wurden anschließend vier Pflanzen (Nr. 19, 23, 36, 40; (Tab. A8)) für den Aufbau der spaltenden F₂' Nachkommenschaft ausgewählt. Damit wurde das Saatgut von 1.289 Pflanzen für den Aufbau der hochauflösenden F₂' Population verfügbar. Abschließend konnten Blattmaterial und F₃' Saatgut von 967 Pflanzen geerntet werden.

4.1.2 Erstellung einer Ausgangskarte der *gai* Region mit 200 Individuen

Um den technischen Aufwand so gering wie möglich zu halten, wurde die weitere Markerabsättigung der Zielregion in einer auf 200 F_2' Pflanzen begrenzten Kartierungspopulation durchgeführt. Die Auswahl dieser Pflanzen erfolgte nach dem Zufallsprinzip aus den verfügbaren 967 F_2' Individuen der hochauflösenden Population. Zunächst wurden die Marker MWG2058, MWG2287 und cMWG658 genetisch analysiert, die im Vorversuch (Absch. 4.1.1) mit dem *gai* Locus cosegregiert hatten. Dabei ergab sich, als Ausgangssituation für die Markerabsättigung, die in Abbildung 6 dargestellte Verteilung der untersuchten Marker mit einem genetischen Fenster von 5,2 cM um den Genlocus. Die Integration des *gai* Locus in die Karte basiert



auf den, im GA_3 -Sämlingstest an F_3' Individuen bonitieren phänotypischen Daten. Für die Selektion weiterer flankierender RFLP-Marker kam die von MICHELMORE et al. (1991) und GIOVANNONI et al. (1991) beschriebene 'Bulked Segregant Analysis' (BSA) zum Einsatz. Basierend auf den beobachteten Genotypen der Einzelpflanzen im 6,2 cM umfassenden MWG2058 - cMWG658 Intervall der Ausgangskarte wurden jeweils isogene DNA-Pools für die Kreuzungseltern und ein Pool mit heterozygoten Pflanzen erstellt.

4.2 Markerabsättigung der *gai* Region mit Hilfe von Reis-EST-Sonden

4.2.1 Identifikation einer syntänen Region im Reisgenom

Für die Markerabsättigung der *gai* Genomregion sollte die syntäne Beziehungen zwischen Gerste und Reis genutzt werden. Hierfür war es zunächst erforderlich die Zielregion im Reis zu bestimmen. Aus den Daten integrierter Gräserkarten (AHN et al. 1993; VAN

DEYNZE et al. 1995; GALE und DEVOS 1998) ging hervor, daß die Chromosomen der Triticeae-Gruppe 2 grundsätzlich mit Kopplungsblöcken aus den Reischromosomen 4 und 7 korrespondieren (Abb. 7). Durch die Kombination von Kartierungsdaten aus den vergleichenden Analysen zwischen Gerste und Reis von SAGHAI MAROOF et al. (1996) und aus der integrierten Gerstenkarte von QI et al. (1996), konnte für die *gai* Region eine mögliche Syntänie zum Reischromosom 7L nachgewiesen werden. Den entscheidenden Hinweis lieferten die RFLP-Marker B15C und Bmy2, die SAGHAI MAROOF et al. als Ankermarker zwischen dem Gerstenchromosom 2H und dem Reischromosom 7 etabliert hatten. Darüber hinaus ist B15C in der integrierten Gerstenkarte eng mit dem *gai* flankierenden Marker MWG2054 gekoppelt, während Bmy2 mit MWG2058 cosegregiert (Abb. 7).

An Hand weiterer Ankermarker, die in der Gerste außerhalb der *gai* Region positioniert waren, konnte zusätzlich eine exaktere relative Zuordnung der Reischromosomsegmente 7L, 4S und 4L zum Gerstenchromosom 2H hergestellt werden (Abb. 7). Dabei wurde die Region um das GA-sensitive Verzweigungsgen *gal* (*GA-less*; BÖRNER et al. 1999) auf dem Gerstenchromosom 2HL dem Reischromosom 4L, das die GA-sensitiven Reisloci *Dwarf1-2* / *Dwarf2* trägt, zugeordnet (VAN DEYNZE et al. 1995; SAGHAI MAROOF et al. 1996).

Basierend auf diesen Informationen wurde die Anwendbarkeit der Reis – Gerste Syntänie für die Absättigung der *gai* Region untersucht. Hierfür wurden im Labor verfügbare Ankermarker für die Triticeae-Gruppe 2 und das Reischromosom 7 genutzt, die zuvor im Rahmen vergleichender EGRAM (European Gramineae Mapping Program, EU framework IV) Studien kartiert worden waren. Insgesamt konnten aus den EGRAM Markersets 1 und 2 acht EST-Sonden unterschiedlicher Herkünfte untersucht werden: die Gersten-Sonde BCD855, die Weizen-Sonden PSR8 und PSR146, die Mais-Sonde CSU109, die Hafersonden CDO385 und CDO405, die Reis-Sonde R2401 und die Sorghum-Sonde SbrPG663. Im BSA-Poolscreening detektierte die Gersten-Sonde BCD855 einen einzelnen Polymorphismus mit *EcoRV*

restringierter DNA, alle weiteren Sonden zeigten zwar auswertbare Hybridisierungssignale, erwiesen sich aber in der Zielregion als monomorph. Die anschließende Kartierung von BCD855 5,6 cM distal vom Genlocus lieferte einen experimentellen Beweis für die vermutete Syntänie zwischen beiden Genomregionen (Abb. 8).

Für die Identifikation weiterer Markerkandidaten erschien in erster Linie die japanischen Kopplungskarte (HARUSHIMA et al. 1998) des RGP als vielversprechendes Instrument, da diese Karte mit 1.455 integrierten Reis-EST-Sonden eine hohe Markerdichte aufweist. An Hand des Markers BCD855 konnte lediglich eine syntäne Region in der Reiskarte von CAUSSE et al. (1994) identifiziert werden, ebenso wenig hilfreich waren die Ankermarker B15C und Bmy2. Mit dem Gerstenmarker ABG716 wurde allerdings der entscheidende Anker für die theoretische Verknüpfung zwischen der *gai* Region und einem möglichen syntänen Abschnitt auf der RGP-Karte gefunden. ABG716, in der Reiskarte als B2F2 bezeichnet (Abb. 7), cosegregiert in den integrierten Gerstenkarten von QI et al. (1996) und LANGRIDGE et al. (1995) mit dem Marker MWG557, der im Vorversuch 4,9 cM proximal vom *gai* Locus kartiert hatte (Abb. 7). Basierend auf dieser Verbindung wurde ein 30,2 cM umspannendes Segment der RGP-Reiskarte, mit dem Ankerlocus B2F2 (ABG716) im Zentrum, für die weitere Untersuchung ausgewählt.

Die anstehende Verifizierung der vermuteten Homologie erfolgte zunächst unter Verwendung von Gersten-EST-Sonden aus der B-EST-Datenbank in Gatersleben. Diese Sonden waren schnell verfügbar und wiesen für die Hybridisierung mit genomischer Gersten-DNA, bedingt durch eine höhere Stringenz gegenüber Reismarkern, technische Vorteile auf. In einem Vorscreening wurden alle 42 EST-Marker aus der abgesteckten Reisregion auf Sequenzhomologien mit den damals zugänglichen 13.109 (05, 2000) Gersten-ESTs untersucht. Die durchgeführten BLASTN-Analysen basierten auf den im Abschnitt 3.5.4.1 beschriebenen Kriterien für eine signifikante Sequenzhomologie. Auf diese Weise konnten acht Gersten-ESTs mit signifikanten Homologien zu den untersuchten Reis-ESTs identifiziert

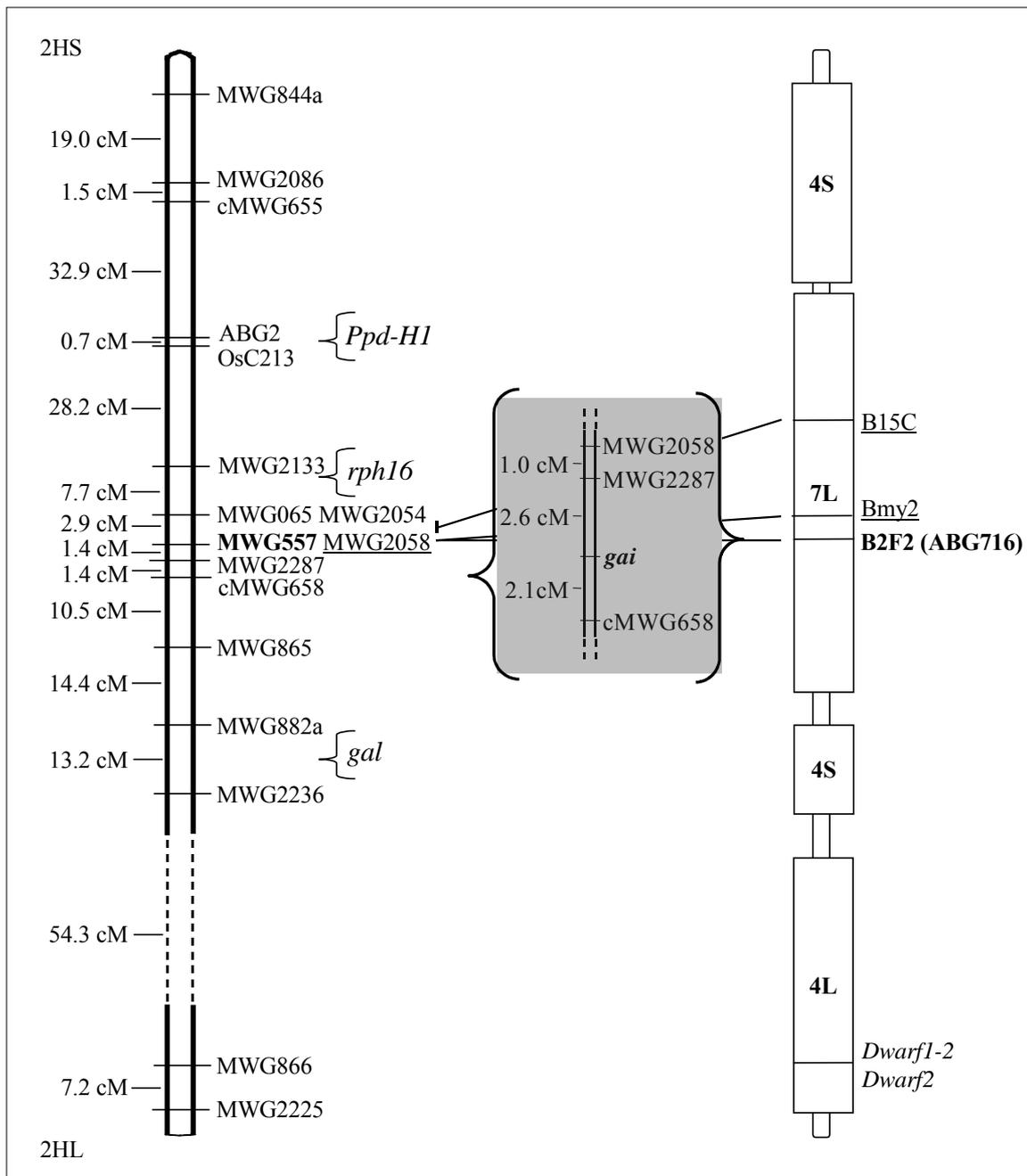


Abbildung 7: Generelle Zuordnung des Gerstenchromosoms 2H (Igri' x 'Franka', GRANER et al. 1994) zu konservierten Segmenten der homologen Reischromosomen 4 und 7. Gezeigt wird die theoretische Identifikation der *gai* Region auf Reis 7L an Hand der Ankermarker B15C und Bmy2. Die fett hervorgehobenen Marker B2F2 und MWG557 repräsentieren die Verbindung zur RGP-Reiskarte. Die relativen Positionen der Ankermarker in der integrierten Gerstenkarte (Qi et al. 1996) sind durch Linien angezeigt. Die Chromosomenregionen um die Gene *Ppd-H1* und *rph16* weisen ebenfalls eine Syntänie mit Reis 7L auf. Das 2HL-Segment zwischen dem GA-sensitiven Gen *gal* und MWG866 kann theoretisch der 4L-Region mit den GA-sensitiven Loci *Dwarf1-2* / *Dwarf2* zugeordnet werden.

werden. Diese sind zusammen mit den jeweiligen Reishomologen und den entsprechenden *e*-Werten aus den BLASTN-Analysen in Tabelle 10 aufgeführt. Im anschließenden BSA-Poolscreening konnten die beiden Gersten-ESTs GBR0586 und GBR0337 als Marker in die Gerstenkarte integriert werden, da sie 'single-copy' Polymorphismen mit den Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme *DraI* und *EcoRV* bzw. *BamHI* detektierten. Da die beiden Marker das Verzweigungsgen flankieren, wurde die Syntänie nicht nur weiter verifiziert, sondern es konnte darüber hinaus eine 11,8 cM lange Zielregion in der Reiskarte, zwischen den homologen Reismarkern C1412 und S2279 definiert werden. Die in dieser Region lokalisierten 20 Reismarker waren somit Kandidaten für die weitere Markerabsättigung der Gerstenregion.

4.2.2 Kartierung der ermittelten EST-Marker aus der syntänen Reisregion

Die selektierten 20 Reis-EST-Sonden wurden unmittelbar auf ihre Eignung für die Markerabsättigung in der *gai* Region untersucht. Dabei konnten weitere fünf Marker in die Zielregion der Gerste integriert werden. Die nicht kartierten Reis-ESTs teilten sich auf in 12 in der Zielregion nicht kartierbare und drei nicht auswertbare Sonden (Tab. 10).

Daneben wurde versucht, die mit den Gersten-ESTs GBR0586 und GBR0337 homologen Reismarker S2279 und C1412 ebenfalls direkt in der Gerste zu kartieren. Während dieser Versuch für den Reismarker S2279 erfolgreich war, wobei erwartungsgemäß ein mit dem homologen Gerstenmarker identisches Bandenmuster beobachtet wurde, konnte der zweite Reismarker C1412, auf Grund nicht auswertbarer Hybridisierungssignale, nicht kartiert werden. Die jeweiligen Kartenpositionen für die Reismarker S13453, S1848, C50171, S2279, S980 und C437 im Zielintervall der Gerste sind in Abbildung 8 dargestellt. Drei dieser Marker - S13453, S1848 und C50171 - cosegregierten 0,8 cM distal vom Genlocus. Zwei der kartierten Reismarker, S1848 und C437, konnten nur dominant für das 'Hv287'-Allel ausgewertet werden, eine Unterscheidung zwischen Heterozygotie und Homozygotie für das

Tabelle 10: Reis-ESTs und homologe Gersten-ESTs aus der Zielregion auf dem Reischromosom 7L

Reis 7L cM	Reis ESTs	Gersten ESTs	BLASTN (<i>e</i> -Wert) ²⁾	BSA ³⁾	Gerste 2H ⁴⁾
73.2	C1467	GBR0840	3,9e ⁻⁵⁵	m	-
75.6	C1008	GBR0336	1,4e ⁻³⁰	m	2HL; WBAL
76.7	C1521	GBR0335	3,7e ⁻⁴⁵	m	2HL; WBAL
80.2/81.9	C1485	GBR0333	2,1e ⁻²²	m	-
80.2	S2279a ¹⁾		-		
80.5	R2394	GBR0334	1,2e ⁻²⁶	m	2HL; S/M
80.8	S1563	kein EST	-	-	
81.1–81.4	R1422, R2561, 10051, E1186	kein EST	-	m	
81.1	R1988	kein EST	-	-	
81.4	C437	kein EST	-	p	2HL; Hv/MC
81.4	S980	kein EST	-	p	2HS; Hv/MC
81.9	S2279b ¹⁾	GBR0586	1,3e ⁻⁵¹	p	2HS; Hv/MC; OWB
81.9	E61009	kein EST	-	-	
83.3	R2677	BE603344	2e ⁻²³	m	
83.3–84.1	R1245, S2055, C63010	kein EST	-	m	
84.6	C50171	kein EST	-	p	2HS; Hv/MC
84.9	B2F2 = ABG716⁵⁾	kein EST	-	-	2HS; H/T
88.7	E3930	kein EST	-	m	
89.0	S1848	kein EST	-	p	2HS; Hv/MC
89.3	C51334	kein EST	-	m	
89.8	S13453	kein EST	-	p	2HS; Hv/MC
91.7	C847	kein EST	-	m	
92.0	C1412	GBR0337	9,6e ⁻⁴⁴	p	2HS; Hv/MC
96.1	R3349	GBR0432	4,9e ⁻⁵¹	m	2HS; OWB

'm': monomorph; 'p': polymorph; '-': kein Ergebnis; Die grau hinterlegte Fläche zeigt die definierte syntäne Region auf der Kopplungskarte von Reischromosom 7L.

¹⁾ In der Gerste konnte für S2279 nur der colineare Reislocus bei 81.9 cM (b) bestätigt werden; ²⁾ Wahrscheinlichkeitswerte für das Reis- und Gersten-EST Homologiescreening; ³⁾ BSA: Bulk Segregant Analysis, dargestellt werden nur die Ergebnisse für 'Hv287' x 'Monte Christo'; ⁴⁾ Hv/MC, S/M, OWB, H/T und WBAL bezeichnen jeweils 'Hv287' x 'Monte Christo', 'Steptoe' x 'Morex', „Oregon“ Wolfe Barley, 'Harrington' x 'TR306' und Weizen-Gersten-Additionslinien; ⁵⁾ Gersten-Ankermarker zwischen den syntänen Regionen. Die Informationen über die genetische Position in der Gerste (ABG716) und im Reis (B2F2) sind jeweils der Gersten-Karte von Qi et al. (1996) und der RGP-Reiskarte (HARUSHIMA et al. 1998) entnommen.

‘Monte Christo’-Allel war somit nicht möglich. Für die Sonde S2279, die in der Kopplungskarte des Reischromosoms 7 zwei Loci mit den Positionen 80,2 und 81,9 cM detektiert hatte, konnte in der *gai* Region nur ein Locus bestätigt werden (Tab. 10). Die beiden im Reis cosegregierenden Marker C437 und S980 kartierten in der Gerste als zwei Loci mit einem Abstand von 6,1 cM. Abschließend hatten sich 31,8 % (7 / 22) aller untersuchten Reismarker in der Gerste als informativ erwiesen und zeigten eine zur Reiskarte colineare Anordnung. Als Resultat der Absättigung mit syntänen Reismarkern konnte eine Reduzierung des Zielintervalls von anfangs 5,2 cM auf 1,1 cM erreicht werden.

Entsprechend der im Vorscreening eingeschlagenen Strategie, wurde in einem BLASTN-Screening gegen die dbEST-Datenbank nach zusätzlichen homologen EST-Sonden aus der Gerste oder aus dem nahe verwandten Weizen gesucht. Zu diesem Zeitpunkt (08, 2000) konnten die in der Tabelle 11 aufgeführten homologen EST-Sonden identifiziert werden. Allerdings kam keiner der aufgeführten EST-Sonden eine Bedeutung für die weitere Markerabsättigung zu, da sie entweder außerhalb des untersuchten S2279 – C1412 Reisintervalls lagen, oder bereits als Reissonde (C437) in der Gerste ein polymorphes, bzw. monomorphes (R2677) Bandenmuster gezeigt hatten.

Tabelle 11: Weizen- und Gersten-ESTs (db-ESTs) mit Homologie zu Reis-ESTs aus der syntänen Region auf Reischromosom 7L

ESTs	Pflanze	Gewebe	Reis-EST-Marker	BLASTN (<i>e</i> -Wert)
BE403266	Weizen	Wurzel	R1357	$1e^{-41}$
BE603344	Gerste	Ähre	R2677	$2e^{-23}$
BE446167	Weizen	Wurzel	C437	$2e^{-98}$
BE405601	Weizen	Wurzel	S2089	$6e^{-43}$
BE602062	Gerste	Ähre	S2089	$3e^{-50}$

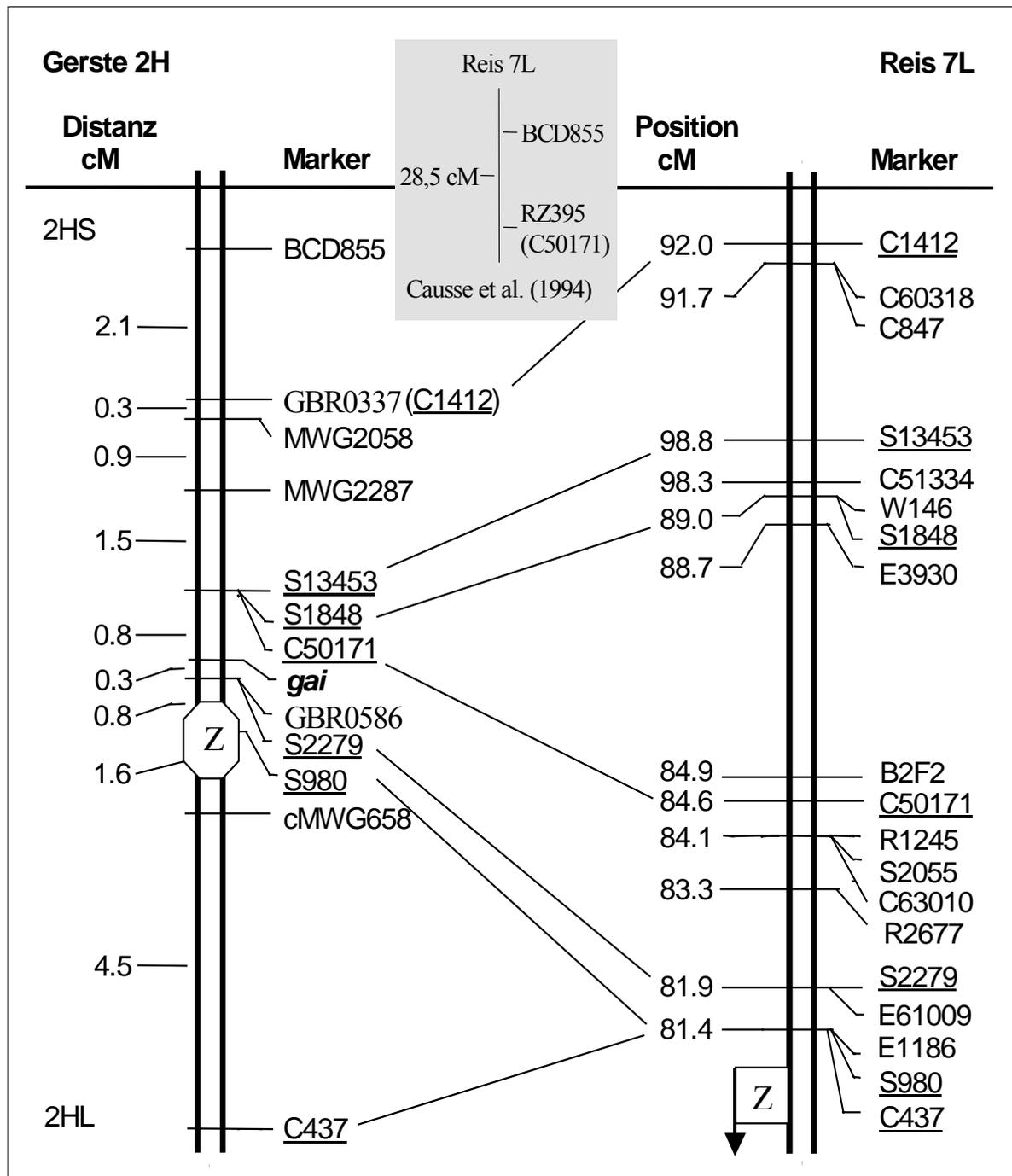


Abbildung 8: Vergleichende Gersten- und Reiskarte in der *gai* Region, basierend auf 200 F₂ Individuen der 'Hv287' x 'Monte Christo' Gerstenpopulation und 186 F₂ Pflanzen der RGP 'Nipponbare' x 'Kasalath' Reispopulation. In der Gerste positionierte Reismarker sind unterstrichen. Die gefundene colineare Markieranordnung zwischen den beiden Chromosomenregionen wird durch Verbindungslinien zwischen den Markern angezeigt. Das graue Feld zeigt die relative Position des Markers BCD855 zum Marker RZ395 (in der RGP-Karte C50171).

4.2.3 Chromosomale Zuordnung der monomorphen Gersten-EST-Sonden

Die chromosomale Zuordnung der für die *gai* Region monomorphen Gersten-ESTs - GBR0840, GBR0336, GBR0335, GBR0333, GBR0334 und GBR0432 - ermöglichte Aussagen über die generelle Homologie zwischen Gerstenchromosom 2H und dem von 10,8 auf 20,5 cM erweiterten C1467 - R3349 Intervall auf Reischromosom 7L (Tab. 10). Diese Untersuchung war möglich, da die *gai* Region in ein 2HS- und in ein 2HL-Segment geteilt ist. Dadurch konnte für die untersuchten Gersten-ESTs an Hand ihrer jeweiligen chromosomalen Armlokalisationen indirekt eine homologe oder nicht homologe Position relativ zur *gai* Region und zum Zentromer bestimmt werden. Weitergehende Erkenntnisse über den Colinearitätsgrad der untersuchten ESTs zum Reis konnten auf diese Weise allerdings nicht gewonnen werden, da ein direkter Bezug zur vergleichenden Karte in der *gai* Region nicht hergestellt werden kann.

Für die chromosomale Zuordnung der ausgewählten Gersten-ESTs wurden zwei unterschiedliche Strategien eingesetzt. Zunächst wurde die Möglichkeit einer genetischen Zuordnung mittels RFLP-Kartierung in den, im Labor verfügbaren Standardkartierungspopulationen 'Steptoe' x 'Morex' (KLEINHOFs et al. 1993) und 'Dom' x 'Rec' ("Oregon" Wolfe Gerste) untersucht. Für jene EST-Sonden, die sich auch in diesen Populationen als nicht kartierbar erwiesen hatten, wurde anschließend eine PCR-basierte Zuordnung mittels Weizen-Gersten-Additionslinien (ISLAM et al. 1981) versucht.

Mittels RFLP-Kartierung konnte die EST-Sonde GBR0334 in der Population 'Steptoe' x 'Morex' auf dem kurzen Arm von Chromosom 2H lokalisiert werden, weitere homologe Loci im Genom wurden dabei nicht aufgedeckt. Die EST-Sonde GBR0432 wurde in der Population 'Dom' x 'Rec' ("Oregon" Wolfe Gerste) auf dem langen Arm von Chromosom 2H lokalisiert, auch diese Sonde wies keine duplizierten Loci auf. Die verbleibenden EST-Sonden - GBR0840, GBR0336, GBR0335 und GBR0333 - wurden an Hand der verfügbaren Sequenzinformationen zunächst in STS-Marker konvertiert (Tab. A4). Die PCR-

Amplifikation der Marker erfolgte unter Verwendung ditelosomer Weizen-Gersten Additionslinien als Target (Tab. 4). Dabei zeigten die ESTs GBR0336 und GBR0335 eine klare Bande auf der ditelosomen Linie 2HL und kein PCR-Produkt im DNA-Mix der übrigen Linien. Für die ESTs GBR0840 und GBR0333 war keine eindeutige Zuordnung möglich, da keine Trennung der Gerstenbanden vom Weizen ('Chinese Spring') -Hintergrund erreicht werden konnte.

Die chromosomale Armlokalisierung von vier der sechs untersuchten Gersten-ESTs deutet bereits eine, über die 10,8 cM umfassende *gai* Region hinausgehende, generelle Homologie zwischen beiden Chromosomen an, da alle zugeordneten Sonden homologe Armlokalisierungen gezeigt hatten (Tab. 10). Somit konnte ein auf 20,5 cM erweitertes Segment von Reischromosom 7L indirekt mit dem Gerstenchromosom 2H verknüpft werden.

Daneben wurde untersucht, ob der Gersten EST GBR0586, wie sein Homolog S2279b im Reis, einen duplizierten Locus (S2279a) in der Gerste aufweist (Tab. 10). Die Gerstensonde konnte in der Population 'Dom' x 'Rec' ("Oregon" Wolfe Gerste) kartiert werden und detektierte dabei ebenfalls nur einen Locus. Offensichtlich ist der Locus R2279 / GBR0586 tatsächlich nur im Reis dupliziert.

4.2.4 Translokations-Kartierung der *gai* Region in der Gerste

FAVRET et al. (1975) und BÖRNER et al. (1999) hatten in ihren jeweiligen genetischen Untersuchungen die *gai* Region auf dem kurzen Arm des Gerstenchromosoms 2H in der Nähe des Zentromers lokalisiert. Dagegen zeigten die Daten der genetisch integrierten physischen Gerstenkarte für Chromosom 2H (KÜNZEL et al. 2000), daß eine zweifelsfreie Zuordnung des Genlocus zum kurzen Arm nicht bestätigt werden konnte. Die physische Karte des Gerstengenoms basiert auf der genauen Lokalisation von Translokationsbruchpunkten (TBs) in der hochauflösenden 'Igri' x 'Franka' RFLP-Karte (GRANER et al. 1991, 1993), wobei die

genetischen Marker cytogenetisch definierten chromosomalen Subregionen zugeordnet werden. Dabei waren die Marker MWG2287 und cMWG658, die in dieser Untersuchung den *gai* Locus flankieren, physisch auf dem kurzen und dem langen Arm lokalisiert worden (Abb. 9), jeweils in Subregionen (definiert durch die TBs T26aab und T24ak), welche die Zentromerregion unmittelbar flankieren. Die Positionierung der genetischen Zielregion in der Zentromerregion mußte als problematisch betrachtet werden. In diesem Fall hätte die kartengestützte Klonierung des *gai* Gens in der Gerste, auf Grund der extrem ungünstigen Rekombinationsfrequenzen, als aussichtslos interpretiert werden müssen (KÜNZEL et al. 2000; SANDHU und GILL 2002). Um eine zweifelsfreie physische Zuordnung des *gai* Locus zu ermöglichen, wurde der Gersten-ESTs GBR0586 in die physische Karte integriert (Abb. 9). Da die physische Kartierung in einer PCR mit markerspezifischen Primern und der DNA definierter mikroisolierter Translokationschromosomen als Template besteht, wurde GBR0586 zunächst in einen STS-Marker konvertiert (Tab A4). Die eigentliche PCR-basierte TB-Kartierung des STS-Markers GBR0586 erfolgte dann im Labor von Dr. G. Künzel am IPK in Gatersleben. Die Präsenz des untersuchten Markers in der DNA des TB T26aab (MWG2287) bestätigte die Lokalisation des *gai* Locus auf dem kurzen Chromosomenarm, damit konnte die Zentromerregion relativ genau zwischen GBR0586 und cMWG658 in die genetische Karte der *gai* Region integriert werden, wodurch das untersuchte Intervall in ein 2HS- und ein 2HL-Segment geteilt wird (Abb. 8). Das Verhältnis physischer zu genetischer Distanzen im genetischen Intervall MWG2287 – GBR0586 beträgt ca. 4,3 Mb / cM.

4.3 Hochauflösende RFLP-Kartierung der *gai* Region

Die genetisch hochauflösende Karte im Bereich eines Zielgens ist eine wichtige Grundlage für die kartengestützte Klonierung, da nur auf diese Weise die Positionen enggekoppelter Marker möglichst genau bestimmt werden können. Flankierende Marker mit

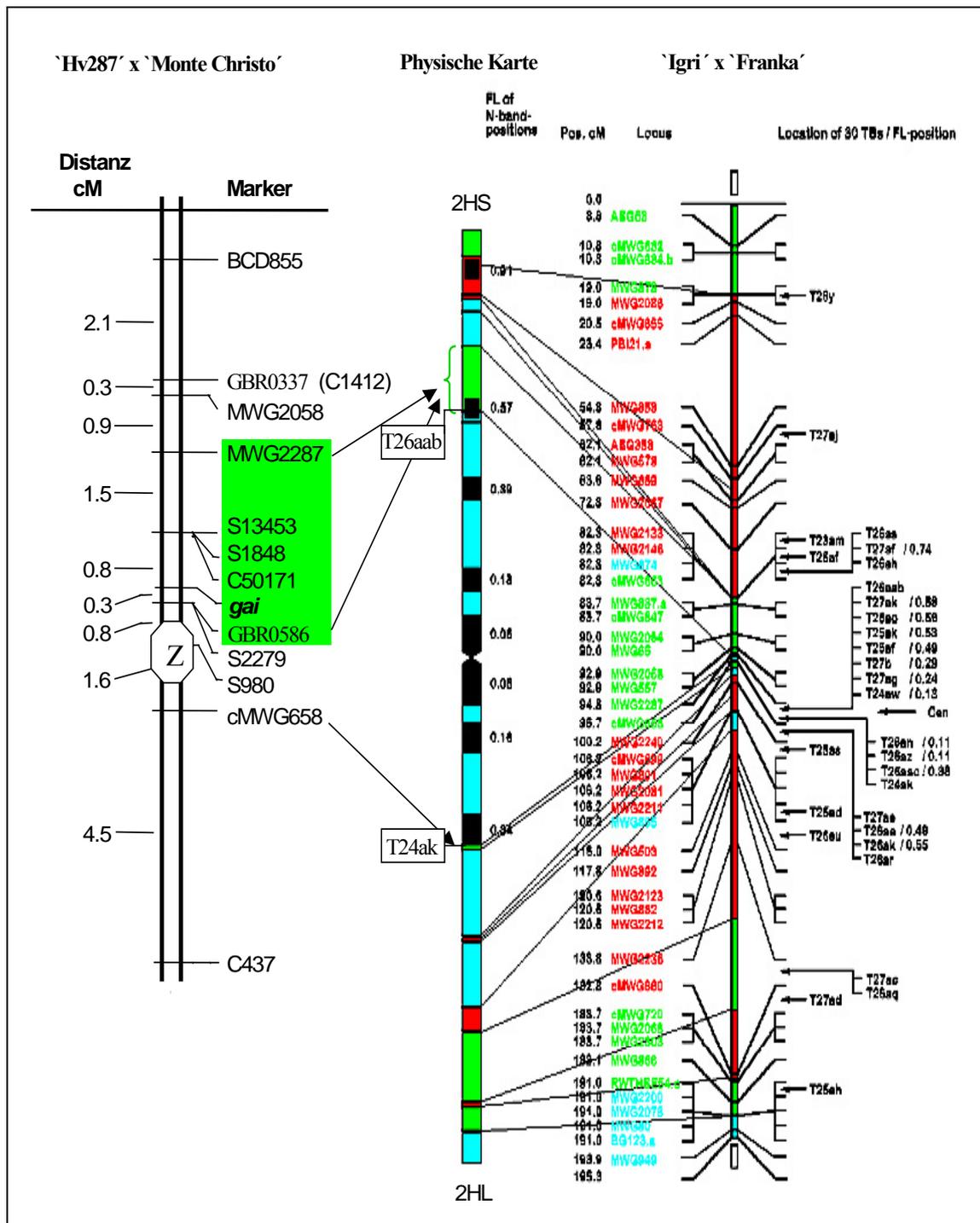


Abbildung 9: Physische Lokalisation des *gai* Locus auf 2HS

Gezeigt werden die genetische Karte der *gai* Region (links) und die genetisch integrierte physische Karte von Chromosom 2H (rechts, aus KÜNZEL et al. 2000), sowie die Translokations-Kartierung der Marker cMWG658 (T24ak), MWG2287 und GBR0586 (T26aab). Subregionen mit ähnlichen Rekombinationsfrequenzen sind farblich gekennzeichnet (blau: > 4,4 Mb / cM; grün: 1,0 – 4,4 Mb / cM; rot: ≤ 1,0 Mb / cM)

einem geringen Abstand zum Zielgen, sind für eine erfolgreiche Isolierung von hochmolekularen Gersten-DNA-Fragmenten aus YAC- oder BAC-Banken erforderlich. Daneben ist die hochauflösende Karte eine wichtige Voraussetzung für eine Klonierungsstrategie, die eine vergleichende Kartierung einbezieht.

4.3.1 Strategie für die hochauflösende Kartierung der *gai* Region

Bisher basierte die genetische Analyse der relativen Markerreihenfolge zum Verzweigungsgen *gai*, aus Gründen der einfacheren Handhabung, auf einer begrenzten Population aus 200 F₂' Pflanzen. Für den Aufbau der hochauflösenden Karte standen weitere 767 F₂' Pflanzen der 'Hv287' x 'Monte Christo' Population zur Verfügung. Allerdings stellen, sowohl ein zuverlässiger GA₃ Sämlingstest, als auch eine RFLP-Kartierung mit 767 F₂' Pflanzen einem erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand dar. Deshalb wurde eine Strategie gewählt, die es erlaubte, in den verbleibenden Pflanzen nur diejenigen Individuen zu identifizieren, die für die untersuchte Region informativ sind. Im Folgenden wurde, basierend auf den niedrigauflösenden Kartierungsdaten, daß 5,0 cM umfassende Intervall MWG2287 - cMWG658 für die anstehende Analyse der Verteilung *gai* gekoppelter Rekombinationsereignisse ausgewählt. Mittels RFLP-Analyse wurden die Spaltungsdaten für MWG2287 und cMWG658 in der gDNA aller 767 Pflanzen ermittelt. Insgesamt konnten für 747 Pflanzen die Hybridisierungssignale beider Marker ausgewertet und dabei 67 Pflanzen mit einem Crossover im untersuchten Intervall selektiert werden. Aus diesen Rekombinanten mußten drei Pflanzen (Nr. 864, Nr. 927 und Nr. 949) von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, die kein F₃' Saatgut für den GA₃-Test gebildet hatten. Die verbleibenden 64 Pflanzen wurden zusammen mit den 18 Rekombinanten aus der niedrigauflösenden Population zu 'Rekombinanten-Filter' mit insgesamt 82 Individuen für die hochauflösende RFLP-Kartierung zusammengestellt (Tab. A9). Basierend auf den

Segregationsdaten von 944 Pflanzen entspricht dies einer maximalen genetischen Auflösung von 0,05 cM.

Unter den insgesamt 85 beobachteten informativen Genotypen sind nur bei einer Pflanze (Nr. 200) beide Chromosomen für den MWG2287 – cMWG658 Abschnitt rekombinant, während alle übrigen Pflanzen nur ein rekombinantes Chromosom besitzen.

Die Integration des *gai* Locus in die hochauflösende Karte basierte auf den phänotypischen Daten, die für alle rekombinanten F₃' Pflanzen im GA₃-Sämlingstest erhoben worden waren. Abschließend wurde ein 4,5 cM umfassendes Intervall für die hochauflösende Karte definiert, das somit 0,05 cM kleiner ist als das Intervall der niedrigauflösenden Population. Die beobachteten Rekombinationsfrequenzen sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Rekombinationsfrequenzen im hochauflösenden MWG2287 – cMWG658 Intervall (947 Individuen) mit den unterhalb der Diagonale dargestellten zugehörigen LOD-Werten

	MWG2287	<i>gai</i>	cMWG658
MWG2287	●	0,0258	0,0465
<i>gai</i>	335,35	●	0,0187
cMWG658	292,47	360,58	●

4.3.2 Genetisch hochauflösende Karte der *gai* Region

Die während der Markerabsättigung im Intervall zwischen MWG2287 und cMWG658 positionierten Marker wurden in die auf 944 Linien erweiterte F₂' Population integriert. Die Spaltungsdaten der betroffenen Marker - S13453, S1848, C50171, GBR0586 (S2279), S980 - wurden mittels RFLP-Analyse auf den entsprechenden enzymatisch geschnittenen 'Rekombinanten-Filtern' ermittelt. Die ursprünglich festgestellte Reihenfolge und die Positionen der Marker relativ zum Verzweigungsgen konnten in der erweiterten Population bestätigt werden. In Abbildung 10A sind diese Positionen in der hochauflösenden 'Hv287' x

‘Monte Christo’ Karte dargestellt. Die vormals cosegregierenden Marker C50171, S1848 und S13453 kartierten nun mit Distanzen von 0,05 und 0,1 cM getrennt voneinander und offenbarten dabei eine colineare Anordnung mit den entsprechenden Loci aus der Reiskarte.

Eine Änderung der Markerdistancen konnte für das auf dem kurzen Arm gelegene *gai* – MWG2287 Intervall nicht beobachtet werden, wogegen sich die Distanz des *gai* – cMWG658 Intervalls auf dem langen Armsegment von ursprünglich 2,7 cM (niedrigauflösend) auf 1,75 cM deutlich verringert hatte. Das durch die eng flankierenden Marker GBR0586 (S2279) und C50171 definierte Zielintervall um den *gai* Locus hatte sich nur unwesentlich auf 1,2 cM erweitert.

Neben den Reismarkern aus der syntänen Reisregion der RGP-Kopplungskarte zeigt die hochauflösende Gerstenkarte auch drei weitere Reis-EST-Marker: S20451, C30454 und R10429 (Abb. 10A). Die Integration dieser Marker erfolgte, nachdem ein zur *gai* Region korrespondierender YAC-Contig im Reis identifiziert werden konnte (Abb. 10C). Dabei wurden S20451 und C30454 flankierend zum Verzweigungsgen kartiert, wobei der proximale Marker S20451 durch eine Rekombination (0,05 cM) und der distale Marker C30454 durch neun Rekombinationen (0,5 cM) vom Genlocus getrennt wurden. Die Weizen-ESTs BG314153, BG608073 und der Gersten-EST HZ53O02 wurden nach der Identifikation des BAC-Contigs verfügbar (Abb. 10B) und kartierten jeweils in cosegregierenden Positionen mit S20451 und C30454. Durch die Integration von EST-Sonden aus der physischen Reisregion in die genetisch hochauflösende *gai* Region, konnte ein finales Zielintervall von 0,55 cM definiert werden.

Alle χ^2 -Werte für die Spaltungsdaten (Tab. 13) entsprechen der erwarteten 1 : 2 : 1 Spaltung, bzw. der 3 : 1 Spaltung für den dominanten Marker S1848, da signifikante Abweichungen von den erwarteten Spaltungsverhältnissen nicht beobachtet werden konnten. Die entsprechenden Rekombinationsfrequenzen und zugehörigen LOD-Werte für die hochauflösende Karte sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 13: Spaltungsdaten aller Loci in der hochauflösenden Karte (944 Individuen) mit den entsprechenden χ^2 -Werten

Locus	`MC'- Allel	`Hv'- Allel	heterozygot	Dominanz `MC'- Allel	fehlende Daten	χ^2 -Wert ¹⁾
MWG2287	234	237	473		0	0,0 ^{n.s.}
S13453	234	235	475		0	0,0 ^{n.s.}
S1848	-	234	-	710	0	0,0 ^{n.s.}
C50171	234	234	476		0	0,1 ^{n.s.}
R10429	234	235	475		0	0,0 ^{n.s.}
C30454	238	235	466		3	0,1 ^{n.s.}
HZ53002	237	236	467		4	0,0 ^{n.s.}
<i>gai</i>	236	239	469		0	0,1 ^{n.s.}
S20451	236	240	468		0	0,1 ^{n.s.}
BG608073	236	240	468		0	0,1 ^{n.s.}
BG314153	236	240	468		0	0,1 ^{n.s.}
GBR0586	236	242	460		6	0,4 ^{n.s.}
S2279	236	242	460		6	0,4 ^{n.s.}
S980	236	243	459		6	0,5 ^{n.s.}
cMWG658	229	255	460		0	2,0 ^{n.s.}

`MC': `Monte Christo'; `Hv': `Hv287'

¹⁾ ^{n.s.} nicht signifikante Abweichung von den erwarteten (3:1 / 1:2:1) Spaltungsverhältnissen bei $P > 0,05$ (χ^2 1FG, 3,84 / 2FG 5,99)

4.4 Physische Kartierung der *gai* Region im Reis

Insgesamt konnten sieben Reismarker aus der RGP-Kopplungskarte direkt oder indirekt in colinearer Anordnung in die niedrigauflösende Gerstenkarte integriert werden. Diese Colinearität blieb auch für die verbleibenden fünf Reismarker in der hochauflösenden Gerstenkarte erhalten und definierte dabei ein 1,2 cM umfassendes Zielintervall zwischen den Markern S2279 und C50171. Basierend auf diesem Resultat konnte der Versuch unternommen werden, mittels der WWW verfügbaren genomischen DNA-Banken und Sequenzdaten für die Reispflanze, einen Wechsel auf das physische System im Reis zu unternehmen. Dabei bestand das primäre Ziel darin, über die Identifikation von korrespondierenden Reis-YAC-Klonen zusätzliche Marker Kandidaten aus den zahlreichen YAC-positionierten, aber genetisch nicht kartierten Reis-EST-Sonden zu erschließen. Gleichzeitig wuchsen mit den zunehmenden

Tabelle 14: Rekombinationsfrequenzen in der hochauflösenden Karte (944 Individuen) mit den unterhalb der Diagonale dargestellten zugehörigen LOD-Werten

Locus	MWG2287	S13453	S1848	C50171	R10429	C30454 ¹⁾	<i>gai</i>	S20451 ²⁾	S2279 ³⁾	S980	cMWG658
MWG2287	●	0,0128	0,0117	0,0155	0,0160	0,0209	0,0258	0,0263	0,0276	0,0314	0,0450
S13453	371,76	●	0,0011	0,0027	0,0032	0,0080	0,0128	0,0133	0,0145	0,0183	0,0317
S1848	205,21	226,13	●	0,0000	0,0011	0,0064	0,0096	0,0106	0,0128	0,0182	0,0349
C50171	363,47	409,66	228,93	●	0,0005	0,0053	0,0101	0,0106	0,0118	0,0156	0,0290
R10429	361,77	406,86	226,19	420,28	●	0,0048	0,0096	0,0101	0,0113	0,0150	0,0285
C30454	347,18	387,75	213,68	398,66	400,79	●	0,0048	0,0053	0,0064	0,0091	0,0220
<i>gai</i>	349,79	372,86	209,60	381,61	383,47	401,69	●	0,0005	0,0016	0,0053	0,0187
S20451	334,05	371,18	208,09	380,11	381,91	399,86	422,38	●	0,0011	0,0048	0,0182
S2279	329,87	366,60	204,51	375,51	377,20	394,69	416,35	418,62	●	0,0037	0,0140
S980	320,42	355,30	196,19	363,66	365,22	384,06	399,66	401,58	405,70	●	0,0102
cMWG658	292,31	323,41	177,62	330,78	332,04	350,54	360,58	361,98	370,74	383,71	●

Die jeweiligen homologen und / oder cosegregierenden Marker HZ53O02¹⁾, BG608073 / BG314153²⁾ und GBR0586³⁾ werden hier nicht aufgeführt

Fortschritten des IRGSP die Aussichten, ebenfalls korrespondierende BAC-Klone zu identifizieren und deren Sequenzen hinsichtlich präsenster EST-Sonden und möglicher Kandidatengene zu analysieren. Tabelle 15 faßt die aktuell verfügbaren genomischen Ressourcen für das Reischromosom 7 zusammen.

Tabelle 15: Ressourcen der genetisch integrierten physischen Karten für das Reischromosom 7 (Stand 03 / 2002)

	Klone	Gesamtlänge der annotierten Klone (Mb)	Abdeckung (%) ¹⁾	EST-Marker	Ø EST-Dichte (EST / 100 kb)
YACs	238	27,8	83,4	503	1,81
BACs	281	30,3	86,6	292	0,96

¹⁾ Referenz ist die kalkulierte Gesamtlänge von 35 Mb für das Chromosom 7 (CHEN et al. 2002). Der Literaturwert für die YAC-Karte (WU et al. 2002) wurde dieser Kalkulation angepaßt.

4.4.1 Identifikation des orthologen YAC-Contigs

Die Sichtung der genetisch integrierten Reis-YAC-Karte erfolgte auf der Grundlage, der zwischen Gerste und Reis beobachteten syntänen Beziehung. Das heißt, alle in den beiden definierten Regionen positionierten Marker, also auch diejenigen, die sich in der Gerste als nicht kartierbar erwiesen hatten, wurden für das computergestützte 'chromosome landing' berücksichtigt. Auf diese Weise konnten die beiden überlappenden YAC-Klone Y6722 und Y1931 in den Daten der physischen Karte identifiziert werden, die über die Reismarker R2677 und R1245 genetisch mit der syntänen Reisregion gekoppelt waren. Beide Marker wiesen in der RGP-Kopplungskarte Positionen innerhalb des syntänen Zielintervalls S2279 - C50171 auf, waren aber in der Gerste nicht kartierbar (Abb. 10A, C und D). Somit konnte die Anbindung des YAC-Contigs an die Gerstenregion zunächst nur unter Vorbehalt angenommen werden. Mit der Identifikation der beiden YAC-Klone wurden allerdings 11 weitere EST-Sonden verfügbar, deren Präsenz auf dem Kandidaten-Contig aus den Daten der YAC-Karte hervorging (Tab. A6). Das anschließende BSA-Poolscreening identifizierte die Sonden S20451, C30454 und R10429 als neue Marker, deren Rückkartierung in die 'Hv287' x 'Monte Christo' Gerstenpopulation verankerte das untersuchte Contig direkt mit der Gerstenregion (Abb. 10A und C). Die Orientierung des Contigs war eindeutig, da S20451 auf dem Klon Y6722, C30454 auf beiden Klonen und R10429 auf dem Klon Y1931 detektiert worden waren. Alle drei EST-Sonden weisen Positionen in der Gerstenkarte auf, die ihren jeweiligen physischen Positionen im Reis entsprechen.

Durch die weitere Verringerung des Zielintervalls von anfangs 5,2 cM auf nun mehr 0,55 cM, zwischen den flankierenden Marker S20451 und C30454, war das primäre Ziel einer weiteren Markerabsättigung einstweilen erreicht worden. Die Größe des identifizierten Contigs wird in den Daten der YAC-Karte mit 625 kb angegeben, basierend auf den Größenbestimmungen für Y6722 (400 kb) und Y1931 (470 kb), abzüglich einer durchschnittlichen überlappenden Region von ~250 kb. Zusätzlich konnte diesen Daten entnommen werden, daß die syntäne

Reisregion in einem überdurchschnittlich rekombinationsarmen Bereich positioniert ist, der mit 359 kb / cM über dem durchschnittlichen genetisch – physischen Verhältnis von 244 kb / cM (CHEN et al. 2002) liegt.

4.4.2 Identifikation und Analyse des orthologen BAC-Contigs

Wie für die Identifikation des Reis YAC-Contigs bereits beschreiben, wurden auch die elektronisch verfügbaren Daten der Reis-BAC / PAC-Bibliothek hinsichtlich eines korrespondierenden Contigs gesichtet. In dieser Datenbank konnten die vier Marker E61009, R2677, R1245 und S13453 aus der syntänen Reisregion gefunden werden. Alle EST-Marker waren zuvor an Hand ihre Sequenzhomologien mit BAC / PAC-Klonen in die Datenbank aufgenommen worden. Eine unmittelbare Verbindung zur Gerste konnte zunächst über die Marker E61009 und S13453 hergestellt werden, da E61009 in der Reiskarte mit S2279 cosegregierte und S13453 direkt im 2HS-Segment der Gerstenregion kartiert worden war. Mit dem 7,9 cM umfassenden genetischen Reisintervall S2279 – S13453 waren insgesamt 16 BAC / PAC-Klone assoziiert, wovon 13 Klone bereits sequenziert waren.

Erst nach der Kartierung der YAC-Sonden S20451, C30454 und R10429 in die *gai* Region eröffnete sich die Möglichkeit durch ein auf diese Marker gestütztes, elektronisches 'chromosome walking' das Ausgangs-Contig zu reduzieren. Für das anstehende Screening auf Sequenzhomologien wurden jene 12 BAC / PAC-Klone als mögliche Kandidaten ausgewählt, die dem genetischen S2279- R1245 Intervall zugeordnet worden waren und deshalb die YAC-Region repräsentieren sollten. In den durchgeführten BLASTN2-Sequenzanalysen konnten alle drei Marker jeweils mit 100%iger Sequenzhomologie auf einem der untersuchten BAC/PAC-Klone plaziert werden. So wurden die BACs OJ1047_C01 (AP003985), OJ1710_H11 (AP003846) und OJ1364_B10 (AP003840) jeweils durch die Marker S20451, C30454 und R10429 detektiert. Damit konnte abschließend eine durch sieben BAC- und ein PAC-Klone definierte physische Reisregion identifiziert werden (Abb. 10A und B). Dieser

Reisregion entspricht in der Gerste ein genetisches Intervall von 1,05 cM. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine vollständige BAC / PAC-Karte aus definierten Contigs vorlag, mußten die selektierten Klonsequenzen in weiteren BLASTN2-Analysen miteinander verknüpft werden, um Informationen über die Größe des Contigs, sowie über die jeweilige Orientierung der einzelnen Klone zu erhalten. Klone mit homologen Endsequenzen wurden auf diese Weise verknüpft und die beobachteten Überlappungen in der anschließenden Kalkulation der Contig-Größe berücksichtigt. Die Abbildung 10B zeigt das erstellte BAC-Contig in einer maßstabsgetreuen Darstellung der jeweiligen Positionen assoziierter Reis-ESTs und überlappender BAC-Regionen. Durch die Integration des Contigs in die genetische Gerstenkarte der *gai* Region zeigte sich, daß letztlich vier BAC-Klone ganz oder teilweise das 0,55 cM umfassende Zielintervall zwischen S20451 und C30454 abdecken.

4.4.2.1 Genetisch-physische Beziehungen zwischen Gerste und Reis

An Hand der BLASTN2-Sequenzanalysen konnten die physischen Positionen der *gai* flankierenden Marker abgelesen werden. Dabei waren S20451 in der 41 kb-Position auf BAC OJ11047_C01 (AP003985) und HZ53O02 in der 0,63 kb-Position auf BAC OJ1710_H11(AP003846) präsent. Dadurch wurde es möglich, nach erfolgreicher Orientierung von OJ11047_C01 (AP003985), die Grenzen des Zielcontigs zu bestimmen.

Basierend auf diesen Informationen und den Größenangaben aus der RGP-BAC / PAC-Datenbank, ließ sich die Länge der korrespondierenden physischen Reisregion berechnen. Für das in Abbildung 10B grau hinterlegte Zielcontig wurde so eine Länge von ~224 kb ermittelt. Für das gesamte Contig zwischen den BACs OJ11047_C01 (AP003985) und OJ1364_B10 (AP003840) wurde eine Größe von ~645 kb berechnet, die somit recht genau der 625 kb Distanz des YAC-Contigs entspricht (Abb. 10B und C).

Durch die Integration der beiden Reis-Contigs in die genetisch hochauflösende Karte der *gai* Region wurde ein direkter Vergleich der beiden Systeme möglich, der eine Aussage über das

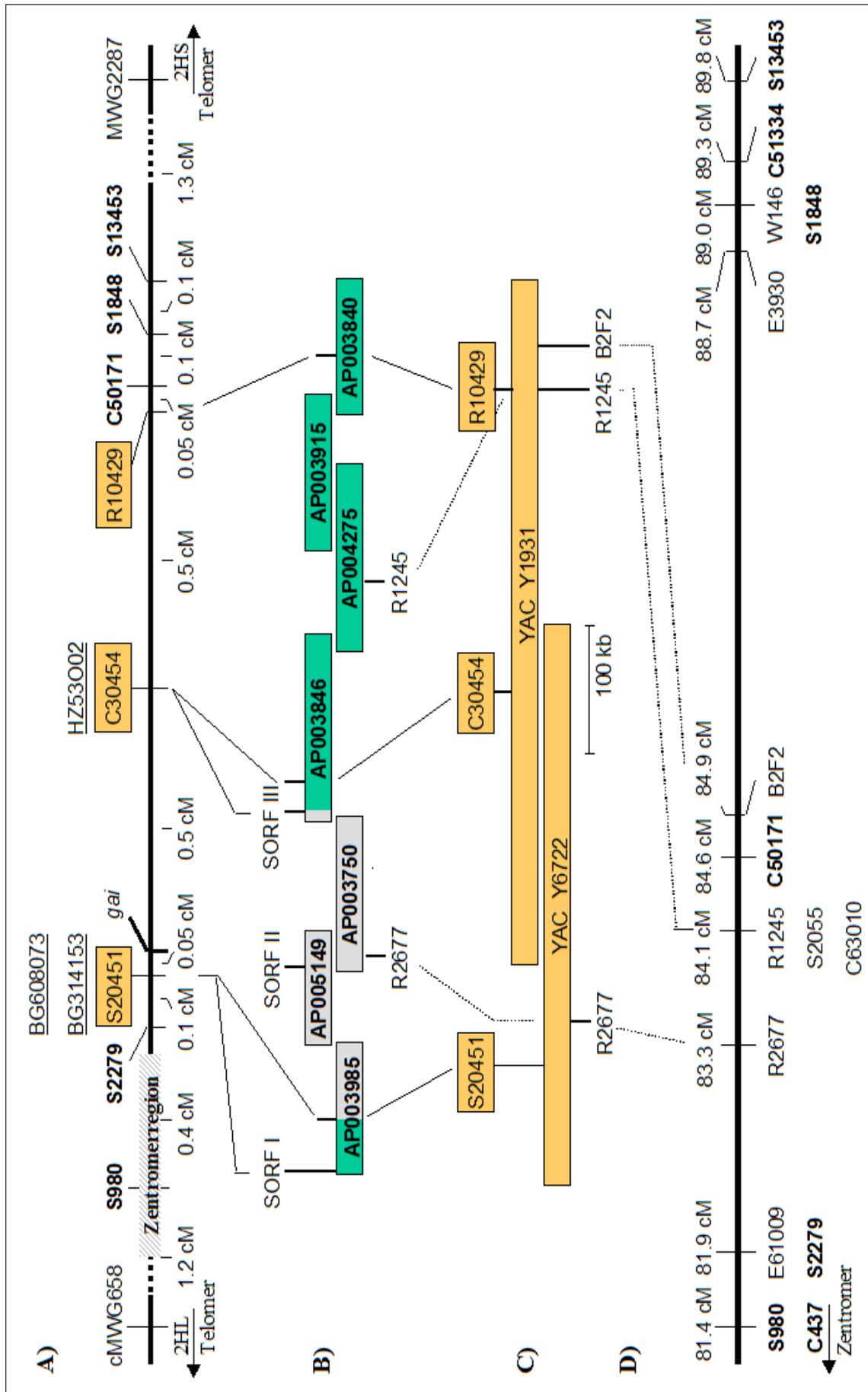


Abbildung 10A-D (vorherige Seite): Intergenomische Kartierung der *gai* Region in Gerste und Reis

Genetische (A und D) und physische (B und C) Karten von Gerstenchromosom 2H und Reischromosom 7L. (A) Hochauflösende Gerstenkarte. Reismarker im Fettdruck entstammen der RGP Kopplungskarte, orange hinterlegte Reismarker dem identifizierten Reis-YAC-Contig; Weizen und Gersten-ESTs mit Sequenzhomologien zu den Reis-ORFs SORF I und III sind unterstrichen. (D) Syntäne Region in der RGP Kopplungskarte. In der Gerste kartierte Reismarker sind im Fettdruck dargestellt. (C) Reis-YAC-Contig mit ausgewählten YAC-lokalisierten Reis-ESTs. (B) Reis-BAC-Contig. Die Zielregion ist grau hinterlegt und zeigt die physischen Positionen von drei putativen Signaltransduktions-ORFs (SORF I / II / III). Die korrespondierenden YAC- und BAC-Contigs wurden durch computergestützte Zuordnung untereinander und durch Markeranalyse mit der genetischen Gerstenkarte verankert (schwarze Verbindungslinien), die Verankerung mit der genetischen Reiskarte entstammt den entsprechenden RGP-Daten (gestrichelte Linien). Die gezeigten genetischen und physischen Verhältnisse sind maßstabsgetreu dargestellt.

genetisch-physische Verhältnis in der Zielregion erlaubte. Die Gegenüberstellung zwischen den 0,55 cM der Gerstenkarte mit den ~224 kb der syntänen physischen Reisregion entspricht einem genetisch-physischen Verhältnis von 407 kb / cM zwischen Gerste und Reis. Innerhalb der Gerste wurde der *gai* Locus in einer physischen Subregion mit einem erwarteten genetisch-physischen Verhältnis von 4,3 Mb / cM lokalisiert, das entspräche für die *gai* Region einer maximalen physischen Zielregion von 2365 kb.

4.5 Computergestützte Analyse der BAC- / PAC-Sequenzen

Die im Rahmen des IRGSPs zur Verfügung gestellten Bioinformatikressourcen beinhalten u.a. auch automatisierte Sequenzstrukturanalysen für die bereitgestellten BAC / PAC-Sequenzen. Die so gewonnenen unterschiedlichen biologischen Informationen sind über das Internet verfügbar (RiceGAAS). Mit der Verfügbarkeit der Sequenzstrukturdaten aller vier BAC-Klone des Zielcontigs wurde es möglich, die entsprechenden Daten gezielt hinsichtlich möglicher Kandidaten für das Verzweigungsgen *gai* zu sichten. Als GA-

insensitives Gen gehört *gai* zu den Signaltransduktionsgenen (Absch. 2.1.2), von denen die bisher identifizierten Genprodukte weitgehend in ihren Funktionen und Sequenzen charakterisiert und in entsprechenden Referenzdateien abgelegt worden waren. Damit lagen Informationen über den möglichen Funktionszusammenhang des gesuchten Gens vor.

4.5.1 Genomorganisation in der Reis-Zielregion

Innerhalb der ~252 kb umfassenden physischen Zielregion waren insgesamt 64 Genloci, bzw. ORFs (**O**pen **R**eadin**G** **F**rame) identifiziert worden. In dieser Zählung blieben jene ORFs unberücksichtigt, die für repetitive DNA-Elemente, wie Retroposons oder Transposons codieren. ORFs, die in überlappenden BAC-Regionen lokalisiert sind, wurden nur einmal gezählt. Die vorgefundene Gendichte lag bei 25 detektierten Genloci pro 100 kb und ist somit konsistent mit den 15 bis 25 Genen / 100 kb, die durchschnittlich im Reis beobachtet wurden (SANDHU und GILL 2002). Für 14 ORFs waren an Hand der vorhergesagten Proteinsequenzen homologe Proteine detektiert worden (Abb. 11). Diese sind dementsprechend als 'putative-' oder '-like protein' bezeichnet. Die übrigen vorhergesagten Proteinsequenzen konnten entweder keinem bekannten Protein ('hypothetical protein') oder nur einem EST ('unknown protein') zugeordnet werden. In den RiceGAAS-Daten hatten sechs der charakterisierten ORF-Sequenzen Reis-ESTs detektiert, insgesamt wies die untersuchte Region 15 Reis-EST-Loci auf (Abb. 11, Tab. A7).

Unter den 14 funktionell zugeordneten Genloci befanden sich nur drei ORFs für putative Signaltransduktionsgene, die deshalb näher untersucht wurden. SORF (**S**ignaltransduction-**O**pen **R**eadin**G** **F**rame) I wurde in der 3,7 kb-Position auf dem BAC OJ1047_C01 (AP003985) und der SORF II wurde in der 55,8 kb-Position auf dem BAC OSJNBb0005G07 (AP005149) lokalisiert. Die vorhergesagten Genprodukte dieser beiden ORFs hatten in den BLASTP-Analysen des RiceGAAS-Annotationssystems spezifische Sequenzhomologien zu Proteinen der GRAS-Familie gezeigt (Absch. 2.1.2). Einen Eindruck davon vermitteln die in

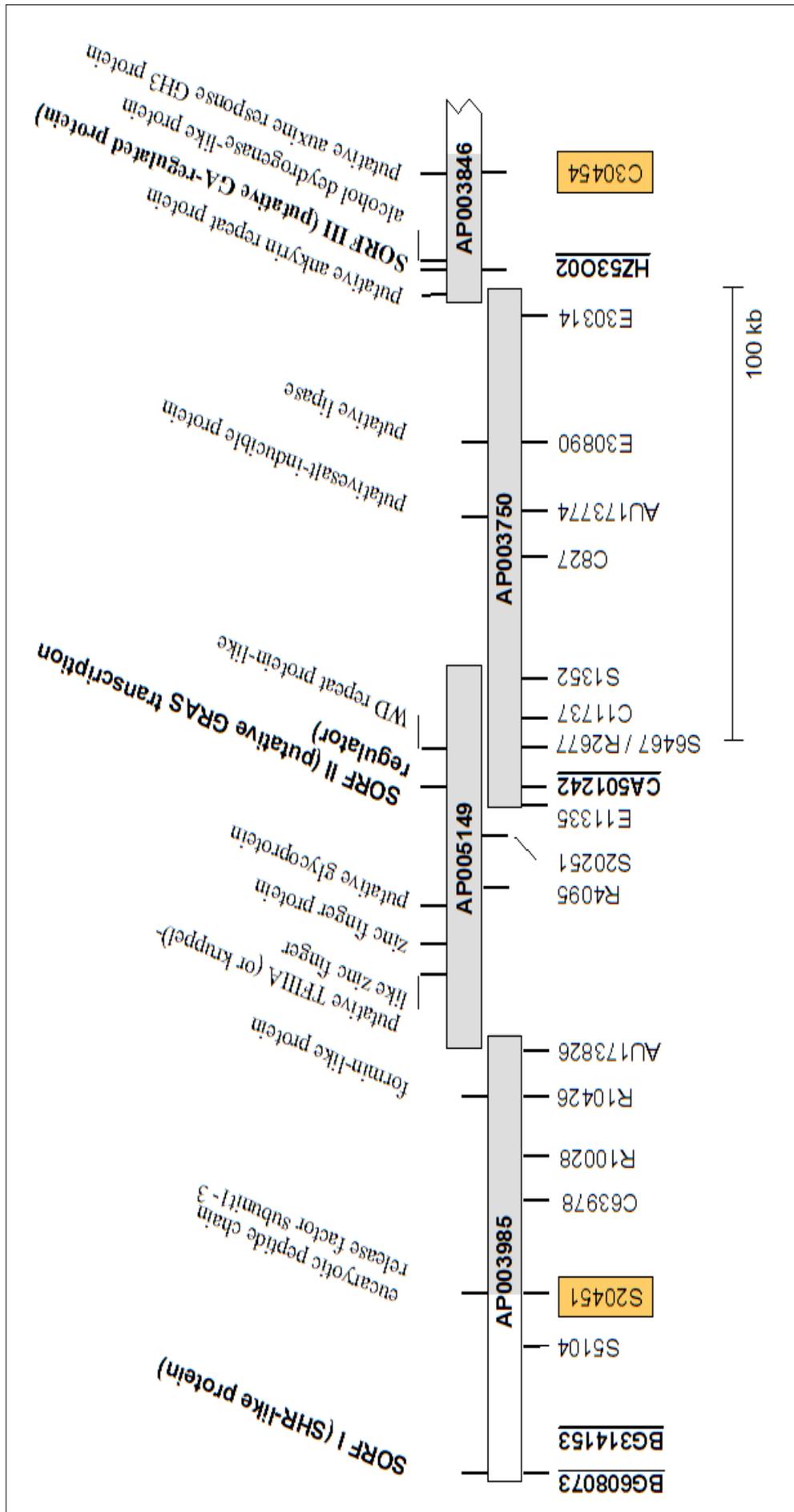


Abbildung 11: Darstellung des *gai* orthologen Reis-BAC-Contigs (RiceGAAS-Daten). Die Zielregion ist grau hervorgehoben und zeigt in der oberen Hälfte 14 ORFs für die signifikant homologe Proteine detektiert werden konnten. Die Bezeichnungen für SORF I / II / III wurden vom Autor an Hand der durchgeführten Analysen vergeben. Die untere Hälfte zeigt elektronisch zugeordnete Reis-ESTs. Die im Verlauf dieser Arbeit zugeordneten ESTs sind durch Unterstreichung (Weizen- und Gersten-ESTs) oder orange Kästchen (Reis-ESTs aus der YAC-Karte) hervorgehoben.

Tabelle 16 zusammengestellten Resultate aus den für diese Arbeit ergänzend durchgeführten BLASTX-Analysen in der dbEST-Datenbank. Gezeigt wird nur die Top-10-Liste, der mit den SORF I und II detektierten Proteine, die sich wie ein „Who`s Who?“ von bekannten Vertretern der GRAS-Familie lesen läßt. Allerdings wiesen die GA-regulierten Proteine aus der GRAS-Familie – RGL1, OsGAI, RGA1 - nicht die höchsten Ähnlichkeitswerte mit SORF I und II auf.

SORF III wurde in der 6,3 kb-Position auf dem Klon OJ1710_H11 (AP003846) gefunden. Die Charakterisierung als putatives GA-Signaltransduktionsgen war über dem Nachweis einer GASA Proteindomäne erfolgt, die spezifisch für die GASA-Familie von Arabidopsis GA-Regulatorproteinen ist (AUBERT et al. 1998). Die BLASTX-Analyse detektierte zudem zwei weitere GA-regulierte Proteine, allerdings müssen die beobachteten Homologien, entsprechenden den in Abschnitt 3.5.4.1 beschriebenen Kriterien, als eher schwache Ähnlichkeiten bezeichnet werden (Tab. 16). Somit konnte für SORF III ein direkter, aber unsicherer Bezug zur GA-Signaltransduktion hergestellt werden.

4.5.2 Analyse möglicher *gai* Kandidatengene im Reis

Die DNA-Sequenzvergleiche zwischen SORF I, II und III ergaben keine signifikanten Homologien. Eine Sichtung der TIGR Reis-Genomdatenbank hinsichtlich möglicher duplizierter Loci konnte für keine der drei untersuchten Sequenzen einen oder mehrere zusätzliche Loci im Reisgenom identifizieren. BLASTN-Analysen in der dbEST- und der B-EST-Datenbank detektierten für SORF I drei signifikant homologe Weizen-ESTs - BE417369, BG314153, BG608073 - und für SORF III den signifikant homologen Gersten-EST HZ53002. Für SORF II konnte lange Zeit kein homologer EST in einer der beiden Datenbanken identifiziert werden, bis der Weizen-EST CA501242 im November 2002 in der dbEST-Datenbank verfügbar geworden war (Tab. 16).

Tabelle 16: Charakterisierung von drei putativen Signaltransduktions-ORFs (SORF I - III) aus der physischen Zielregion im Reis (02 / 2003)

SORF	BAC-Klon (kb-Position)	putative Funktion	EMBL Accession	BLASTX (e-Wert)	homologe ESTs	BLASTN (e-Wert)	Pflanze
I	AP003985 (3,7)	SHR (SHORT-ROOT)	AY074547	1e ⁻¹¹⁶	BE417369	0.0	Weizen
		putative protein	NP_190564	2e ⁻³⁷	BG314153	1e ⁻¹¹⁵	Weizen
		Ls (Lateral suppressor)	AF098674	1e ⁻³⁴	BG608073	1e ⁻⁷⁵	Weizen
		putative SCR (SCARECROW)	AAM08829	5e ⁻³⁴			
		RGL1 (RGA-like1)	NP_186995	8e ⁻³²			
		OsGAI (Oryza sativa L. GA-INSENSITIVE)	AB030956	3e ⁻³³			
RGA1 (REPRESSOR OF GAI)	Y11336	3e ⁻²³					
II	AP005149 (55,8)	putative protein	NP_190564	1e ⁻¹¹⁶	CA501242	2e ⁻⁸⁴	Weizen
		putative SCR (SCARECROW)	AAM08829	2e ⁻³⁷			
		SHR (SHORT-ROOT)	NP_195480	1e ⁻³⁵			
		RGL1 (RGA-like1)	NP_186995	2e ⁻²⁶			
		putative OsGAI	BAB40172	6e ⁻²²			
		RGA1 (REPRESSOR OF GAI)	Y11336	3e ⁻²¹			
OsGAI (Oryza sativa L. GA-INSENSITIVE)	AB030956	2e ⁻²⁰					
III	AP003846 (6,2)	GA-stimulated transcript1 like protein	AB015475	5e ⁻¹³	CA026026	1e ⁻⁶³	Gerste
		GA-regulated protein	AC005396	2e ⁻¹¹	BQ609302	3e ⁻⁵¹	Weizen
		GASA5-like protein	AF051753	6e ⁻⁰⁷			

In weiteren Untersuchungen wurde versucht, die selektierten Reisloci in der Gerstenkarte des Verzweigungsgens zu lokalisieren. Für die Integration von SORF I konnten von den verfügbaren ESTs BG314153 und BG608073 codominante RFLP-Marker entwickelt werden, die mit S20451 cosegregierten. Ebenso war es möglich SORF III über den EST HZ53O02 in der Gerstenkarte zu lokalisieren, und zwar in einer cosegregierenden Position mit C30454 (Abb. 10A). Damit waren die putativen *gai* Kandidaturen dieser Reisgene widerlegt. Da für die Lokalisation des nun verbleibenden Kandidaten SORF II im Rahmen dieser Arbeit keine homologe EST-Sonde gefunden wurde, konnte dessen Position in der Gerste nicht mehr untersucht werden.

Zusätzlich zu den Kartierungsanstrengungen wurden Vergleichsanalysen zwischen den beiden vorhergesagten Proteinsequenzen von SORF I und II und den Sequenzen von sechs wesentlichen GRAS-Proteinen - GAI, OsGAI, Rht-D1, SCR, SHR, Ls - durchgeführt, die jeweils drei Vertreter aus den beiden GRAS-Unterfamilien repräsentieren (Absch. 2.2.2). Dabei sollte vor allem das vorhergesagte Genprodukt von SORF II im Hinblick auf eine mögliche *gai* Kandidatur näher charakterisiert werden, da die Funktionsbeschreibung als 'putative protein' ($1e^{-116}$) unbefriedigend war.

Die Strategie der Multisequenzanalyse ermöglicht die nähere Charakterisierung eines Genprodukts auf zwei Ebenen, einmal über eine phylogenetische Zuordnung zu einem, oder mehreren bereits funktionell charakterisierten Proteinen und zum zweiten über ein direktes Screening der untersuchten Sequenzen hinsichtlich vorhandener Homologien in spezifischen, konservierten Domänen und Motiven. Entsprechende konservierte Domänen und Motive wurden für die Proteine der GRAS-Familie bereits von PYSH et al. (1999) und HELARIUTTA et al. (2000) identifiziert.

In Abbildung 12 ist das Ergebnis dieser Analysen dargestellt. Dabei zeigt Abbildung 12A das Vorhandensein der exklusiven GRAS-Domäne VHIID in der vorhergesagten Proteinsequenz von SORF II und belegt eindeutig die Zugehörigkeit dieses Proteins zur GRAS-Familie und

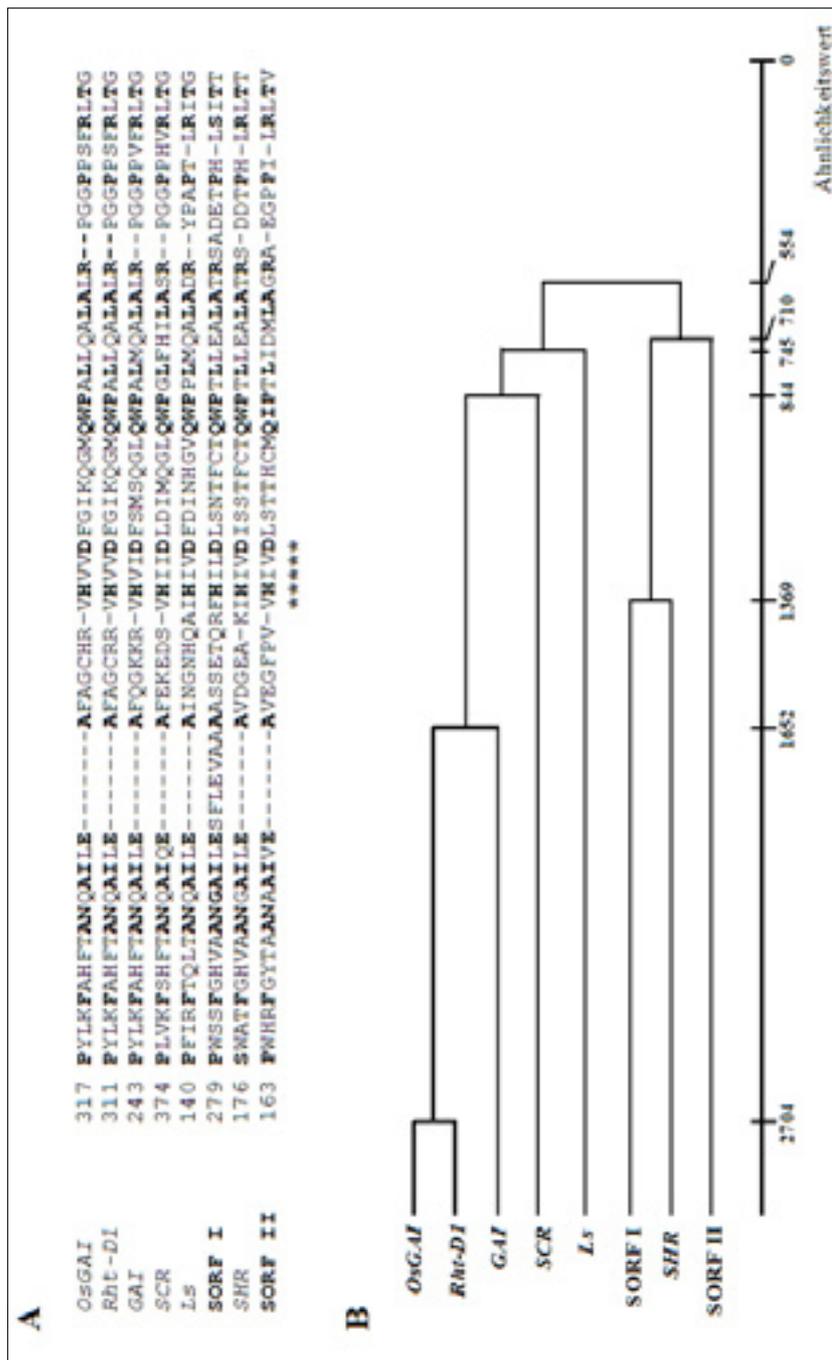


Abbildung 12: Proteinsequenzvergleich und phylogenetische Analyse zwischen zwei putativen Signaltransduktions-ORFs (SORF I und II) aus der syntänen Reigenomregion und sechs funktionell charakterisierten Signaltransduktionsgenen der GRAS Familie. (A) Alignment der vorhergesagten AS-Sequenzen in der GRAS spezifischen VHID-Domäne. Die Nummern vor den Sequenzen verweisen auf die jeweils erste AS des Alignments. Absolut konservierte AS sind durch Fettdruck hervorgehoben, die Sterne zeigen das VHID-Motif. (B) Das Dendrogramm der vorhergesagten AS-Sequenzen basiert auf den Ähnlichkeitswerten, die in paarweisen Sequenzvergleichen ermittelt wurden (PIMA' Software). Dabei waren die Ergebnisse für zwei unterschiedliche Kopplungsalgorithmen identisch.

dessen Funktion als Regulatorkomponente in einer Signalkette. Das in Abbildung 12B dargestellte Dendrogramm, basierend auf den gefundenen Ähnlichkeitswerten zwischen den einzelnen Sequenzen, deutet an, daß SORF II eine Sonderstellung in dieser Familie einnimmt. Offensichtlich ist das vorhergesagte SORF II-Protein mit keinem anderen Protein eng verwandt. Ganz im Gegensatz zu SORF I, dessen Verwandtschaft zum SHR Protein bereits

aus den BLAST-Vergleichen hervorgegangen war. Die beobachteten Verwandtschaften innerhalb der bekannten GRAS-Proteine entsprechen den Erwartungen und können somit als eine positive Kontrolle für die Zuverlässigkeit der Analyse angesehen werden.

5 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Feinkartierung eines GA-insensitiven Verzweigungsgens (*gai*) auf dem kurzen Arm von Chromosom 2H. Die entsprechende Chromosomregion weist ein hohes Maß an Colinearität mit der orthologen Region auf dem Reischromosom 7L auf. Unter Ausnutzung der Syntänie zwischen Gerste und Reis konnte die Zielregion in der Gerste mit EST-abgeleitenden Markern gesättigt werden und im Reisgenom auf einen Bereich von ~224 kb eingegrenzt werden. Die Annotation der Reissequenz führte zur Identifizierung von drei Genen mit putativen Funktionen in der GA-abhängigen Signaltransduktion. Für zwei dieser Gene konnten im Verlauf dieser Arbeit bereits homoeologe Fragmente in der Gerste detektiert werden.

5.1 Molekulargenetische Analyse des *gai* Verzweigungslocus

5.1.1 Strategie der Markerabsättigung

Den Ausgangspunkt für die Feinkartierung der genetischen Region um das Verzweigungsgen *gai* lieferte die von BÖRNER et al. (1999) erstellte Kopplungskarte. Für die Markerabsättigung dieser definierten Region wurden zunächst genetische Karten alternativer Gerstenkreuzungen und integrierte Gerstenkarten im Bereich des Ziellocus hinsichtlich möglicher Markerkandidaten untersucht. Gleichzeitig fanden die integrierten Gerstenkarten des Chromosoms 2H eine Verwendung für die Identifikation möglicher syntäner Genomregionen im Weizen und im Reis. Wie in Abschnitt 2.3.4 bereits dargelegt, konnten ausgedehnte Studien zeigen, daß mittels vergleichender Kartierungen genetische Zielregionen erfolgreich mit syntänen Markern abgesättigt werden können. Dadurch lassen sich aufwendige Sichtungen mit Zufallsmarkern umgehen. Für die Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Syntänie wurden Weizen und Reis ausgewählt, da für beide Gattungen mittlerweile intensiv bearbeitete genetische Karten existieren. Zudem wurden syntäne Beziehungen von Reis und Weizen zur Gerste bereits vielfältig untersucht und nachgewiesen.

Der Weizen bietet gegenüber dem Reis den Vorteil einer engen evolutionären Verwandtschaft (Absch. 2.3.1) und dem daraus resultierenden relativ hohen Grad an Markercolinearität (LIAO und NICKS 1991; DEVOS et al. 1993; HART 1995; NELSON et al. 1995; VAN DEYNZE et al. 1995; DUBCOVSKY et al. 1996). Dagegen weist die Reispflanze den Vorteil des kleineren Genoms auf und ihre Etablierung als Modellgenom für die Gräser (Absch. 2.3.3).

Für die anstehenden Untersuchungen am Beginn der Markerabsättigung wurden die integrierten Gerstenkarten von LANGRIDGE et al. (1995) und QI et al. (1996), sowie die genetischen Karten der Standardgerstenpopulationen (HEUN et al. 1991; KLEINHOFs et al. 1993; GRANER et al. 1991, 1994) eingesetzt. Der Vergleich der Kopplungskarten ergab für die genetische Region um den *gai* Locus, definiert durch das Markerintervall MWG2058 und cMWG658, fünf mögliche Markerkandidaten aus der 'Steptoe' x 'Morex' Karte (KLEINHOFs et al. 1993), wobei es sich bei einem der Kandidaten, dem Marker ABR338, um einen PCR-Marker handelt. Die übrigen vier RFLP-Marker ABC306, ABG316C, ABC468 und CDO675A cosegregierten in der Consensuskarte von QI et al. (1996).

Die Identifikation einer möglichen syntänen Region im Weizen wurde an Hand der Triticeae-Gruppe2-Consensuskarte von NELSON et al. (1995), der Weizenkarte von GALE et al. (1995) und der Gerstenkarte von BÖRNER et al. (1999) möglich. Auf diese Weise konnte eine 8,9 cM umfassende Region unmittelbar am Zentromer der homoeologen Weizenchromosomen 2AS, 2BS und 2DS (GALE et al. 1995) als putativ syntän definiert werden. Die distale Grenze dieser Region markiert der Weizenmarker Xpsr131, der mit einem 21,2 cM Abstand zum *gai* Locus in der Gerste kartiert worden war (BÖRNER et al. 1999). Somit konnten nicht alle zehn Marker aus der Weizenregion als potentielle Markerkandidaten für die Zielregion angesehen werden. Gleichzeitig wurde unter Verwendung der integrierten Gersten- und Gräserkarten für die homoeologen Gruppe-2 Chromosomen (AHN et al. 1993; VAN DEYNZE et al. 1995; SAGHAI MAROOF et al. 1996; GALE und DEVOS 1998) eine Syntänie zwischen der *gai* Region und

einem genetischen Intervall auf dem Reischromosom 7L in der RGP-Reiskarte (HARUSHIMA et al. 1998) zunächst mittelbar (Abb. 7) und dann unmittelbar durch die Integration der homologen Gersten-EST-Sonden GBR0337 (~ C1412) und GBR0586 (~ S2279) lokalisiert und definiert (Abb. 8). Damit konnten aus dem Reis 20 Marker Kandidaten gewonnen werden, im Vergleich zu den vier und den ca. fünf identifizierten RFLP-Marker Kandidaten aus der Gerste und dem Weizen. Deshalb war es naheliegend, die selektierten Reis-EST-Sonden auf ihre Kartierbarkeit in der Gerste zu testen. Zudem bietet der Reis als Modellorganismus mit den heute verfügbaren genomischen Instrumenten und Sequenzinformationen, wie sie im Abschnitt 2.3.3 bereits beschreiben wurden, wesentliche Vorteile für eine kartengestützte Klonierung von Genen aus komplexen Genomen. Denn das 'Gene golfing' Verfahren (ZHANG und WING 1997) der kombinierten genetischen und physischen Kartierung zur wechselseitigen Verringerung beider Zielintervalle, wie es in dieser Arbeit eingesetzt werden konnte, setzt die Verfügbarkeit entwickelter physischer Karten voraus. Diese existieren heute aber nur für die relativ kleine Gräsergenome von Reis und Sorghum und wurden mittlerweile weitgehend genetisch integriert (DRAYE et al. 2001; WU et al. 2002). Dadurch besteht die Möglichkeit an Hand syntäner Marker frühzeitig auf die physische Ebene zu wechseln, und das Modellgenom direkt als intergenomisches Vehikel für die Identifikation neuer Marker Kandidaten oder eines orthologen Gens zu nutzen. Basierend auf den aktuellen Erkenntnissen aus vergleichenden Genomanalysen und den technischen Möglichkeiten der Reispflanze, wurde in dieser Arbeit eine entsprechend angepaßte Strategie verfolgt, wie sie im wesentlichen in Abbildung 5 graphisch dargestellt ist.

5.1.2 Vergleichende Karte der *gai* Region

Faßt man die Ergebnisse der niedrigauflösenden (Abb. 8) und der hochauflösenden Karte (Abb. 10A und D) zusammen, dann beruht die gefundene Colinearität zwischen Gerste und Reis in der untersuchten Region auf der Integration von zehn Reis-EST-Markern, die direkt

oder indirekt (C1412) in der Zielregion kartiert hatten und auf der Präsenz von vier Gersten- und Weizen-EST-Sonden, die entweder als bereits bekannte Ankermarker (BCD855) oder mittelbar über die Identifikation des Reis-BAC-Contigs eine Verknüpfung mit dem Reisgenom hergestellt hatten.

Für den nicht aus der RGP-Karte stammenden Ankermarker BCD855 konnte über die Reiskarte von CAUSSE et al. (1994) indirekt eine konservierte, relative Position in der Gerste angenommen werden. CAUSSE et al. lokalisierten BCD855 auf dem Chromosom 7L mit 28,5 cM distal vom Reis-EST-Marker RZ395, welcher in der RGP-Reiskarte als C50171 bezeichnet wird. Damit stimmt die Reisposition von BCD855, distal von C50171 (RZ395), mit dem in der Gerste beobachteten Locus überein (Abb. 8).

Alle ausschließlich über die physischen Reiskarten genetisch integrierten Reis-, Weizen- und Gersten-ESTs nahmen in der Gerste zu ihren jeweiligen physischen Position korrespondierende Loci ein (Abb. 10A-D). Das heißt, diese Sonden kartierten erwartungsgemäß in das S2279 - C50171 Intervall und halbierten dadurch das genetische Zielintervall in der Gerste. Damit hatte die YAC-Karte des RGP ihre Eignung als weitere Markerquelle neben der genetischen Reiskarte gezeigt und ermöglichte zudem ein anschließendes computergestütztes 'chromosome walking' in den bereits selektierten 16 BAC- / PAC- Klonen des Reisgenoms. Die Identifikation von drei ORFs für putative Gene der GA-Signaltransduktion in der auf ~252 kb reduzierten homologen Reis-BAC-Region bestätigte abschließend die enge Verwandtschaft zwischen beiden Arten in den untersuchten Genomregionen. Zumal zwei dieser ORFs (SORF I und III) in *gai* flankierenden Positionen lokalisiert werden konnten und das finale Zielintervall von 0,55 cM definieren.

Allerdings sind auf Grund der Markerselektion mittels der BSA-Methode keine Aussagen über die Frequenz nicht syntäner Reismarker möglich, die in der Gerste außerhalb der *gai* Region bzw. des genetischen BSA-Fensters liegen. Ein solches genomweites Screening hätte allerdings für das Hauptziel dieser Arbeit, die hochauflösende Feinkartierung der *gai* Region

als Grundlage für die Klonierung des Gens, keinen wesentlichen Informationsgewinn bedeutet.

Interessanterweise offenbarten die Rekombinationsraten der niedrigauflösenden, vergleichenden Kartierung in den untersuchten Regionen von Reis (186 F₂ Individuen) und Gerste (200 F₂ Individuen) eine Differenz in den genetischen Distanzen, wie sie zuvor auch von SAGHAI MAROOF et al. (1996) in einer vergleichenden Studie zwischen dem Gerstenchromosom 2H und dem Reischromosom 7 beobachtet worden war. Dabei hatte sich gezeigt, daß die Kopplungsdistanzen in der Gerste zweimal geringer waren, als jene in der entsprechenden Reisregion. Betrachtet man die in der *gai* Region nachgewiesenen Rekombinationsraten im S980 – C1412 Intervall, so liegen diese in der Gerste bei 4,6 cM und im Reis bei 10,6 cM und bestätigen somit die von SAGHAI MAROOF et al. gemachte Beobachtung. Allerdings entspricht dies nicht einer generellen Tendenz in syntänen Gersten- und Reisregionen, denn der gegenteilige Effekt wurde ebenso beobachtet (SAGHAI MAROOF et al. 1996; HAN et al. 1998). Andererseits kann auch nicht von grundsätzlich größeren genetischen Distanzen in den Genregionen der Gerste ausgegangen werden, da der 10fache Größenunterschied zwischen beiden Genomen hauptsächlich auf repetitiven DNA-Segmenten in den nicht codierenden Genomregionen der Gerste beruht. Die genetischen Distanzen zwischen beiden Genomen sind durchaus vergleichbar (1521 cM im Reis (HARUSHIMA et al. 2002) vs. 1245 cM in der Gerste (KLEINHOFS et al. 1993)). Deshalb sollte eine Syntäniebasierte Strategie berücksichtigen, daß sich die genetischen Distanzen und die Gendichte in den Genregionen großer Genome nicht notwendigerweise von denen in kleineren Genomen unterscheiden müssen (KELLER und FEUILLET 2000).

Einen Eindruck über den weiteren Verlauf der Homologie zwischen Reis und Gerste in unmittelbarer Nähe der definierten Zielregion lieferten die chromosomalen Armlokalisationen von Gersten-EST-Sonden mit Sequenzhomologien zu EST-Markern aus der untersuchten

Reisregion. Da die Zentromerregion von 2HS die *gai* Region teilt, wurde es möglich an Hand der homologen Chromosomenarmpositionen von vier untersuchten Sonden eine von 10,8 (syntäne *gai* Region) auf 20,5 cM erweiterte Region der genetischen Reiskarte mit dem Gerstenchromosom indirekt zu verknüpfen. Keiner der Gersten-ESTs, für die eine Zuordnung möglich war, hatte ein/en nicht homologes/n Chromosom bzw. -arm detektiert, auch wurden keine weiteren Loci in der Gerste entdeckt (Tab. 10). Darüber hinaus wurden und werden auf dem kurzen Arm des Gerstenchromosoms 2H zwei weitere Genregionen an Hand ihrer Syntänie zum Reischromosom 7L untersucht. Die Syntänie der Region um das photoperiodische Kontrollgen *Ppd-H1*, in der 'IGRI' x 'Franka' Karte (GRANER et al. 1993) ca. 50,2 cM distal der *gai* Region positioniert, wurde bereits von LAURIE et al. (1997) über die Kartierung syntäner Markern aus der telomeren Reisregion nachgewiesen. Die Vermutung, *Ppd-H1* könnte das Gerstenortholog des in der untersuchten Reisregion befindlichen photoperiodischen Kontrollgens *Hd2* (YAMAMOTO et al. 1998) sein, konnte bisher nicht eindeutig bestätigt werden (DUNFORD et al. 2002). Wie sich herausstellte, befindet sich die *Ppd-H1* Region genau zwischen den beiden homologen Segmenten der Reischromosomen 4S und 7L. Obwohl zunächst vier Reismarker in konservierter Anordnung in die Gerstenkarte integriert werden konnten, bestätigte sich im Verlauf der Studie, daß vor allem häufige Duplikationen im Reis die vergleichende Kartierung erschweren und eine gezielte Isolierung des Gerstengens *Ppd-H1* im Reis nicht zulassen. Abbildung 7 verdeutlicht die Situation, da sie sowohl den eng mit *Ppd-H1* gekoppelte Reismarker OsC213 (C213 in der RGP-Reiskarte) (LAURIE et al. 1997) als auch die Zuordnung der beiden Reissegmente zum Gerstenchromosom 2HS zeigt

Eine entsprechende Duplikation von Reismarkern konnte im Verlauf der vergleichenden Kartierung in der *gai* Region nur für den Reis-EST S2279 nachgewiesen werden. Dieser hatte in einer anschließenden Kartierung in der Gerstenpopulation 'Dom' x 'Rec' ("Oregon" Wolfe Gerste) über den S2279 homologen Gersten-ESTs GBR0586 nur einen Locus detektiert.

Duplizierte Reisloci wurden auch im Bereich des Weizengens *Ph1* auf Chromosom 5B und der entsprechenden Region auf Chromosom 9 im Reis beobachtet (FOOTE et al. 1997).

Die in vergleichenden Studien zwischen Gerste und Reis häufig beobachteten interchromosomalen Duplikationen von Loci oder ganzen Sequenzregionen im Reis könnten von einer generellen Verdopplung des Reisgenoms ausgehen, die sich in dem Maße in der Gerste nicht ereignet, oder aber wieder verloren hat (MOORE et al. 1993; NAGAMURA et al. 1995; HAN et al. 1998; DUNFORD et al. 2002; SALSE et al. 2002). Der Zeitpunkt, an dem diese Verdopplung in der Reisentwicklung stattgefunden haben könnte, ist nicht bekannt. Entweder ereignete sich diese bereits vor der Abspaltung von einem gemeinsamen Vorfahren, dann wären die untersuchten Genomregionen und -loci zu einem späteren Zeitpunkt in der Gerste durch Deletionen wieder verloren gegangen (DUNFORD et al. 2002) oder sie ereignete sich erst nach der Aufspaltung der Gräser in mehrere Unterfamilien (HAN et al. 1998).

5.1.3 Der Einsatz von EST-Sonden in der vergleichenden Kartierung der *gai* Region

Von den aus der syntänen Reisregion der RGP-Karte gewonnenen 22 Sonden hatten 54,5 % (12 / 22) ein monomorphes Bandenmuster in den BSA-Pools gezeigt und 18 % (4 / 22) der Sonden konnten nicht ausgewertet werden, jeweils zu gleichen Teilen auf Grund einer fehlgeschlagenen Plasmidisolierung und einer zu geringen Signalstärke für die RFLP-Kartierung. Als polymorph in der *gai* Region hatten sich 27,27 % (6 / 22) der untersuchten Reismarker erwiesen. Ein identisches Verhältnis von 27,27 % (3 / 11) zeigte sich für jene Reissonden, die über das YAC-Contig vorselektiert worden waren. Von den nicht kartierten Sonden offenbarten 45,5 % (5 / 11) monomorphe und 27,27 % (3 / 11) schwache Banden in der Hybridisierung. Über zwei Reissonden (R1563 und R1988) kann keine Aussage getroffen werden, da hierbei die Plasmidisolierung für die Sondenpräparation fehlgeschlagen war. Allerdings hatte sich im Verlauf der Markerabsättigung gezeigt, daß beide Sonden außerhalb der syntänen Zielregion liegen (Tab. 10).

Faßt man die Resultate zusammen, so erwiesen sich 27,3 % (9 / 33) der Reissonden in der Zielregion als polymorph und 51,5 % (17 / 33) als monomorph. Damit hatten insgesamt 78,8 % (26 / 33) der untersuchten Reissonden ein auswertbares Signal in der Gerste gezeigt und könnten somit als genetische Marker in der Gerste verwendet werden. Ein Wert der über den 48 % (32 / 67) liegt, die von VAN DEYNZE et al. (1998) in einer generellen Studie über den Einsatz von Reis-EST-Sonden in der vergleichenden Kartierung beobachtet wurden, aber konsistent ist mit den 73 % die VAN DEYNZE et al. (1995) in einer früheren Studie gefunden hatten. Ebenso konnten SMILDE et al. (2001) für 84 % der untersuchten Reis-EST-Sonden ein auswertbares Hybridisierungssignal in der Gerste bestätigen. Diese Werte zeigen, daß Reis-EST-Sonden durchaus eine wesentliche Ressource für molekulare Marker in der Gerste sind.

Im Verlauf der Feinkartierung kamen, neben den untersuchten Reis-ESTs, auch eine ganze Reihe von homologen Gersten- und Weizen-ESTs zum Einsatz. Auf Grund der verfügbaren Sequenzinformationen für EST-Sonden konnten alternativ zu den Reis-Sonden auch homologe Sonden für die Hybridisierung verwendet werden. Die indirekte Kartierung von syntänen Reismarkern über homologe Sonden oder über Sonden einer näher verwandten Art, umgeht technische Probleme, wie sie bei der Hybridisierung auf genomischer Gersten-DNA aus der Heterologie der Reissonden erwachsen können. Die Folgen sind oft Markerverluste durch schwache oder verschmierte Hybridisierungssignale. In dieser Arbeit hatten 15,2 % (5 / 33) der untersuchten Reissonden, auch nach mehrmaligen Versuchen, einen zu starken Hintergrund für eine erfolgreiche Analyse gezeigt. So konnte die Reissonde C1412 nicht direkt in der Gerste kartiert werden, sondern erst über die Kartierung mit dem homologen Gersten-EST GBR0337. Diese EST-Sonde wurde in der hauseigenen B-EST-Datenbank am IPK identifiziert. Die Datenbank enthielt zu diesem Zeitpunkt 13.109 EST-Klone und hatte sich für die schnelle Identifikation der syntänen Region in der RGP-Reiskarte bewährt. In den vergangenen zwei Jahren wurde sie im Rahmen der fortgesetzten Bemühungen zur

Genomanalyse der Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L.) deutlich erweitert und beinhaltet aktuell 111.090 ESTs aus 25 verschiedenen Bibliotheken von unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien. Im Verlauf dieser Arbeit bestätigte sich immer wieder, daß der stetige Datenzuwachs in den einzelnen EST-Datenbanken diese zu einem immer wesentlicheren Instrument für die vergleichende Kartierung macht. So konnten in einer erneuten BLASTN-Analyse in der B-EST-Datenbank zehn Gersten-EST-Sonden an Hand ihrer physischen Positionen in der Reizielregion als weitere Markerandidaten detektiert werden (Tab. A7).

Von entscheidender Bedeutung waren jene EST-Sonden, die über signifikante Sequenzhomologien zu den selektierten Reis-ORFs (SORF I, II und II) identifiziert wurden. So ermöglichten die Gersten- und Weizen-Sonden HZ53O02 und BG608073 / BG314153 die Kartierung von SORF III und I in der Gerste, sowie eine weitere Reduktion der physischen Reisregion auf ~224 kb. Eine wesentliche Bedeutung für die weitere Untersuchung der *gai* Region dürfte dem jüngst in der db-EST-Datenbank identifizierten Weizen-EST CA501242 zukommen, auf Grund seiner Sequenzhomologie mit dem Reiskandidaten SORF II.

5.2 Ausblick für eine kartengestützte Klonierung des *gai* Verzweigungsgens

Jede Markerabsättigung einer definierten Genomregion und / oder Isolierung eines Zielgens, basierend auf einer beobachteten Syntanie, muß zunächst unter dem Vorbehalt geschehen, daß syntäne Beziehungen mit steigender genetischer bzw. physischer Auflösung zusammenbrechen können. So wurden u.a. in vergleichenden Studien nicht selten Brüche in den Markeranordnungen zwischen Reis und Gerste beobachtet, hervorgerufen durch spezifische Umordnungen, die sich im Verlauf der evolutionären Entwicklung beider Genome ereignet hatten. Ebenso zeigte sich, daß selbst bei erwiesenermaßen stabiler Colinearität auf der genetischen Ebene, noch mit einem Zusammenbruch der Colinearität auf der physischen Ebene gerechnet werden muß (Abschn. 2.3.4). Dies ist vor allem für den Einsatz eines weniger komplexen Genoms für die Syntanie-gestützte Klonierung eines orthologen Zielgens

ein limitierender Faktor (FEUILLET und KELLER 2002). Obwohl hiervon die Absättigung der Zielregion mit syntänen Markern nicht notwendigerweise betroffen sein muß, kann dennoch der erhoffte Genkandidat ausbleiben (BRUEGGEMAN et al. 2002). Konsequenterweise unterscheidet man in der Bewertung von Konservierungen zwischen einer Makro- und einer Mikrocolinearität. Dabei bewertet erstere eine beobachtete Colinearität auf der Kartierungsebene. Da die genetische Integration nicht für alle untersuchten Marker erfolgreich sein kann, bleiben die Anzahl und die Abstände der konservierten Loci hierbei unberücksichtigt. Erst die direkte Sequenzanalyse kann nachweisen, ob auch von einer Mikrocolinearität zwischen den untersuchten Regionen gesprochen werden kann, das heißt, ob sich tatsächlich keine Sequenz- oder Genumlagerungen ereignet haben (DUBCOVSKY et al. 2001; ECKARDT 2001). KELLER und FEUILLET (2000) halten das Kriterium der Mikrocolinearität erst dann für gegeben, wenn in Fragmenten von > 50 kb eine stabile konservierte Genanordnung nachgewiesen werden konnte. Wie im Abschnitt 2.3.1 bereits beschrieben, sind die Ursachen für diese Brüche in der Colinearität vielfältiger Natur und umfassen Deletionen, Insertionen oder Translokationen kleinerer DNA-Fragmente sowie Geninversionen und -duplikationen. Die bisherigen Studien über die Größe und Architektur von Chromosomen aus eng verwandten Gräserarten lieferten zwar viele Indizien für die drastischen Veränderungen, die sich innerhalb dieser Genome in relativ kurzen Zeiträumen ereignet haben müssen. Dennoch wiesen vergleichende Kartierungen und Sequenzanalysen immer wieder nach, daß diese Veränderungen in den einzelnen Genomen ungleich verteilt sind, wobei Genregionen stärker konserviert sind, als die nicht codierenden Regionen (CHEN 1998b; SANMIGUEL et al. 1998). Im Vergleich zu den bisher beobachteten Konservierungsgraden innerhalb der Brassicaceae-Arten *Arabidopsis thaliana* und *Brassica nigra* weisen die Arten innerhalb der Poaceae, trotz ihrer größeren Genome und früheren Arttaufspaltung, regelmäßig einen höheren Grad an Colinearität auf (LAGERCRANTZ 1998). Ein Grund hierfür könnte der, sonst so problematische hohe Anteil repetitiver DNA in den

Gräsergenomen sein, denn in polyploiden Pflanzen muß die Paarung homeologer Chromosomen verhindert werden, um aberrante Chromosomensegregationen in der Meiose zu verhindern. Der hohe Anteil an repetitiven Elementen in den Poaceae-Genomen könnte dazu beitragen, diese Paarung zu unterdrücken (GALE und DEVOS 1998). Auch in vergleichenden Untersuchungen von Säugetiergenomen hat man eine überraschend hohe Konservierung zwischen den sequenzierten Genomen von Mensch und Maus nachweisen können. So führten Untersuchungen an Hand des wesentlich weniger komplexen Mausgenoms bereits zu einem besseren Verständnis von Erbkrankheiten bei Menschen, da besonders genregulierte Vorgänge der embryonalen Entwicklung, die vor allem die intra- und interzelluläre Kommunikation betreffen, einen hohen Konservierungsgrad aufweisen (DEHAL et al. 2001). Viele Forscher sehen von daher im Mausgenom ein generelles Modell für die Säugetiergenome, vergleichbar dem Reisgenom für die Poaceae-Pflanzenfamilie.

5.2.1 GA-insensitive Gene: Fortschritte in Richtung elektronische Identifizierung

In der vorliegenden Studie werden für die im Reis identifizierten, syntänen Gene SORF I und III die entsprechenden Orthologe identifiziert. Orthologe Beziehungen zwischen Signaltransduktionsgenen wurden bereits in unterschiedlichen Studien nachgewiesen und gelten heute als herausragende Beispiele für die erfolgversprechende Anwendung einer kombinierten Klonierungsstrategie aus vergleichender Kartierung und EST / cDNA Bankscreening (VAN DEYNZE et al. 1995; FREELING 2001). Vor allem seit, neben einer stetig anwachsenden Anzahl von ESTs, zunehmend auch Proteinsequenzen in diversen Datenbanken verfügbar geworden sind, die eine Identifikation potentiell funktionsrelevanter Domänen und Sequenzmotive ermöglichen (Absch. 2.1.2). Daraus resultierte u.a. auch ein vertieftes Verständnis über die jeweiligen Funktionen von Proteinen in Stoffwechsel-, Resistenz- und Signalprozessen (YUAN et al. 2001). Dieses Wissen dient heute über Sequenzvergleichsanalysen als Instrument, entweder für den Nachweis von Proteinfamilien

und / oder für die gezielte Suche nach entsprechenden Orthologen in verschiedenen Daten- oder cDNA-Banken (ALTSCHUL et al. 1997; CARTINHOOR et al. 1997; FINKELSTEIN et al. 2002). Viele Gene unterschiedlicher Signaltransduktionen wurden mittels EST / cDNA Bankanalysen aus den jeweiligen Arten kloniert. So wurden die GA-regulierten *Rht-D1*, *D8* (PENG et al 1999), *OsGAI* / *SLRI* (OGAWA et al 2000; IKEDA et al. 2001) und *SLNI* (CHANDLER 2002) aus entsprechenden cDNA Bibliotheken von Weizen, Mais, Reis und Gerste an Hand einer *GAI* homologen Reis-EST-Sonde isoliert. Diese Sonde war zuvor auf Grund einer spezifischen DELLA Domäne in ihrer vorhergesagten Proteinsequenz identifiziert worden (SIVERSTONE und SUN 2000). Die Arabidopsis und Capsella Orthologe des *Ls* Gens (ROSSBERG et al 2001; SCHUMACHER et al. 1999) und das Maisortholog des *SCR* Gens (LIM et al. 2000), sowie zahlreiche *SCR*-like Gene aus Arabidopsis (PYSH et al. 1999) wurden mittels gezielter BLAST-Sequenzanalysen in vorhanden EST-Datenbanken identifiziert. Ihre jeweilige Zugehörigkeit zur GRAS-Proteinfamilie wurde an Hand von Aminosäuresequenzvergleichen und dem Nachweis charakteristischer Domänen und Sequenzmotive aufgedeckt. Zudem könnten viele Komponenten der Signaltransduktion ohne diese genomischen Ressourcen sicherlich nie identifiziert werden. Zum Beispiel haben Mutationen in GA-Signaltransduktionsgenen, wie *sly1* (STEBER et al. 1998), die positive Regulatoren codieren, oftmals eine Sterilität oder Letalität der betroffenen Pflanze zur Folge. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß bisher nur wenige positive GA-Regulatorkomponenten kloniert werden konnten (OGAS 1998). Oder aber, die Gene gehören einer Familie mit jeweils redundanten Funktionen an, wie z.B. die *SHI* Genfamilie aus Arabidopsis, die insgesamt neun Mitglieder umfaßt. In diesem Fall ist eine Mutation in nur einem Gen für den Phänotyp irrelevant (FRIDBORG et al. 2001).

Auch für Resistenzgene, die ansonsten eher für ihre bescheidenen oder fehlenden colinearen Beziehungen bekannt sind (LEISTER et al. 1999; RICHTER und RONALD 2000), fanden konservierte Proteindomänen, wie z. B. Leucin reiche Motive (LRRs) (COLLINS 1992;

HAMMOND-KOSACK und JONES 1997; JONES und JONES 1997), zahlreiche Anwendungen ('candidate gene approach') für die Entwicklung spezifischer molekularer Marker (CHEN et al. 1998b; TABOR et al. 2002) und für die Identifikation von Kandidaten aus unterschiedlichen Pflanzenarten (Arabidopsis: PAN et al. 2000; Gerste: BRUEGGEMAN et al. 2002; Mais: COLLINS 1992; Sojabohne: KANAZIN et al. 1996; YU et al. 1996; Tomate: LEISTER et al. 1996, BALLVORA et al. 2001; Weizen: FEUILLET et al. 1997).

Neben den DNA-Sequenzen werden in der Gaterslebener B-EST-Datenbank auch Informationen aus BLASTX-Analysen über putative Genfunktionen einzelner ESTs zur Verfügung gestellt. An Hand dieser Informationen war es möglich, sich in der erweiterten Datenbank (Tab. 9) einen generellen Überblick darüber zu verschaffen, welche potentiellen Gene der GA-Signaltransduktion dort bereits vorliegen und nach homologen EST-Sonden für die selektierten Reisgene SORF I, II, und III zu suchen. Tabelle 17 zeigt jene Gersten-ESTs, die durch eine Abfrage der Datenbank mittels charakteristischer Suchbegriffe gefunden werden konnten, und welche putativen Funktionen ihnen in der BLASTX-Analyse zugewiesen wurden. Das gezeigte Ergebnis kann aber nicht bedeuten, daß darüber hinaus keine weiteren Gene in dieser Kollektion vorliegen. Denn selbstverständlich werden nur solche Gene identifiziert, die in der Vergangenheit bereits charakterisiert worden sind. Zudem sind RNAs von Signaltransduktionsgenen ihrem Wesen und ihrer Funktion nach eher in geringen Konzentrationen und mit nur kurzer Lebensdauer im Cytoplasma vorhanden, als eine Art Hintergrundrauschen der intrazellulären Kommunikation (MCADAMS und ARKIN 1999; GUBLER et al. 2002). Die relativ geringen Clustergrößen, mit maximal 25 ESTs im Sequenzcluster cl1220ct2042cn2719g02, scheinen dies zu bestätigen.

Neben den bekannten GA-regulierten Vertretern der GRAS-Proteinfamilie wurden auch EST-Cluster für zwei GA-stimulierte bzw. -regulierte Proteine aus dem Reis und der Cluster cl4833ct5239cn5864g01 mit einer deutlichen Signifikanz zum *GAMyB* Transkriptionsfaktor

Tabelle 17: Identifizierte Gersten-ESTs mit Homologien zu Genen der GA-Signaltransduktion aus der B-EST-Datenbank (Vers 2.1)

EST-Cluster	ESTs ¹⁾	EMBL-Acc.	BLASTX	(<i>e</i> -Wert) ²⁾
cl2404ct2758cn3254g01 (+ drei ESTs)	HO02M08S	-	<i>OsGAI</i> <i>Rht-D1a</i>	7e-30 3e-32
	HX05N15r HY04L24T	CA030017 AL506960	putative <i>OsGAI</i>	4e-93 1e-54 2e-35 ³⁾
	HA11L04r	BU977589		9e-36
cl4833ct5239cn5864g01	HO02M08S	-	<i>GAI</i>	7e-23
	HT01L14T	BQ466150	<i>GAMyb</i> transcription factor	e-112 ³⁾ e-116
cl1220ct2042cn2719g02 (+ 25 EST)	HA13E16r	BU978457	GA-stimulated transcript1 like protein	6e-35 ³⁾ 3e-35
	HZ53O02r	CA026026	similar to GA-stimulated transcript1 like protein	6e-13
cl317ct511cn715g01 (+ 11 ESTs)	HA02O21r	BQ458886	GA-regulated protein	4e-90 ³⁾ 5e-82

¹⁾ Die ersten beiden Buchstaben in den EST-Bezeichnungen stehen für die jeweilige EST-Bibliothek: **HA**: Samen, Embryosack (0-7 Tage nach der Bestäubung); **HO**: Epidermis; **HT**: Samen, Endosperm; **HX**: Pflanze, Apex; **HY**: entwickelnde Karyopse (3-29 Tage nach der Bestäubung); **HZ**: Samen, Perikarp (0-7 Tage nach der Bestäubung); ²⁾ Aufgeführt sind nur die ESTs (Primer-Code: 5' cDNA-Ende r, S, T und V; 3' cDNA-Ende u) mit den jeweils höchsten *e*-Werten; ³⁾ BLASTX-Score für die Consensus-Sequenz des entsprechenden EST-Clusters

detektiert. Betrachtet man die gewebespezifischen Bibliotheken der selektierten ESTs, so befindet sich die Herkunft der *GAI* / *RGA* Orthologe aus Geweben wie Karyopse, Epidermis, Embryosack und Apex in Übereinstimmung mit Angaben aus der Literatur (MIRALLES et al. 1998; SILVERSTONE et al. 1998). Diese Gene nehmen eine zentrale und universelle Stellung in der GA-Signaltransduktion ein und können deshalb in zahlreichen unterschiedlichen Pflanzenorganen und -geweben mit relativ hohen RNA-Konzentrationen nachgewiesen werden (JACOBSEN et al. 1996; RICHARDS et al. 2001). Ebenso ist die cDNA-Bibliothek aus Geweben wie Endosperm, Aleuron und Perikarp als Quelle für die *GAMyb* homologen ESTs konsistent mit den Literaturangaben (GUBLER et al. 1999).

Von den fraglichen Gersten-ESTs HA13E16, HZ53O02, HA02O21 mit Sequenzhomologien zu GA-regulierten Proteinen konnte nur der EST HZ53O02 (similar to GA-stimulated

transcript1 like protein) elektronisch mittels BLASTN-Analyse ($1e^{-63}$) in die genomische Reizzielregion integriert werden (Abb. 11) und erwies sich dabei als homolog mit der Reissequenz von SORF III. Die anschließende genetische Kartierung in der Gerste, 0,5 cM distal vom *gai* Locus in einer cosegregierenden Position mit C30454, bestätigte diese Beobachtung (Abb. 10A).

Für das Verzweigungsgen *gai* konnte im Vorfeld dieser Arbeit kein bekanntes orthologes Gen aus einer verwandten Art postuliert werden. Eine mögliche Zugehörigkeit zu den *GAI / RGA* Orthologen wurde bereits zu einem frühen Zeitpunkt, auf Grund der nicht orthologen Position auf dem Gerstenchromosom 2H, als äußerst unwahrscheinlich angesehen (BÖRNER et al. 1997, 1998). Letztlich konnte die Gersten-EST-Sonde GBR0327 (putative *OsGAI*) (Tab. 17) nicht in der *gai* Region lokalisiert werden, somit wurde eine mögliche Verwandtschaft des Zielgens mit den *GAI / RGA* orthologen Genen nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch ausgeschlossen.

Interessant ist, daß in den bisherigen Untersuchungen von GA-Signalregulatoren rezessive Verzweigungen charakteristisch für Funktionsverlustmutationen in positiven Regulatorgenen waren, wogegen die bekannten negativen Regulatoren semidominante Mutationen aufweisen (Übersicht: SUN 2000) (Tab. 1). Inwieweit diese Erkenntnisse einen Hinweis auf die mögliche Funktion des in dieser Arbeit untersuchten rezessiven *gai* Verzweigungsgens geben können, darüber kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Zudem gehört *gai* offensichtlich keiner Genfamilie an, entsprechendes wurde bereits für die *gai* Mutante `M.C. (Mutante de Cebada) 90´ (Absch. 3.1.1) nachgewiesen (HOPP et al. 1981).

Bisher gilt allein das im Reis identifizierte Gen SORF II als möglicher Kandidat für *gai*. Aus der in Abbildung 12B dargestellten Sequenzanalyse mit sechs charakteristischen Vertretern der GRAS-Familie wird die Sonderstellung des Reiskandidaten in dieser Proteinfamilie ersichtlich, denn dieser konnte keinem der untersuchten Proteine direkt zugeordnet werden.

Allerdings wurde SORF II in die Untergruppe um den wurzelspezifischen und möglichen positiven Regulator *SHR* eingeordnet. Die Zugehörigkeit zur GRAS-Familie konnte zweifelsfrei durch die Anwesenheit der exklusiven VHIID Domäne im vorhergesagten SORF II Protein bestätigt werden (Abb. 12A). Darüber hinaus konnten die in der Literatur beschriebenen konservierten SAW und PFYRE Sequenzmotive der C-terminalen Region (DI LAURENZIO et al. 1996; PYSH et al. 1999, HELARIUTTA et al. 2000, RICHARDS et al. 2000) nachgewiesen werden. Die Daten der Sequenzanalysen lassen vermuten, daß es sich bei SORF II um ein neues Mitglied der GRAS-Familie handeln könnte. Untersuchungen des *SLRI* Gens aus dem Reis bestätigten, daß die C-terminale Region, einschließlich der VHIID Domäne, in den GAI / RGA orthologen Proteinen für die Hemmung der GA-Aktivität verantwortlich ist. Das Fehlen dieser Proteinregion hatte zu einem Funktionsverlust des negativen Regulators *SLRI* und damit zu einem konstitutiven Höhenwachstum geführt. Da diese Region in allen GRAS-Proteinen konserviert ist, scheint sie eine generelle Funktion in diesen Regulatorkomponenten zu haben. Im Unterschied dazu erwies sich die N-terminale Region, einschließlich der DELLA Domäne, als spezifisch für die GA-Signalerkennung und Deaktivierung der Repressorfunktion von *SLRI* (ITHO et al. 2002).

Folglich verweist die beobachtete VHIID Domäne in SORF II auf ein Transkriptionsregulatorgen, allerdings läßt sich eine Beteiligung dieses Reisgens an der GA-Signalkette allein an Hand dieser Domäne nicht belegen. Dennoch bedeutet das Fehlen der GA-spezifischen DELLA Domäne nicht automatisch, daß SORF II nicht doch in der GA-Signaltransduktion eine Rolle spielen kann. Allerdings erlaubte dieser theoretische Weg keine weiteren Aussagen über eine mögliche *gai* Kandidatur von SORF II. Eine funktionelle Redundanz des Reisgens SORF II kann als unwahrscheinlich angesehen werden, da in einem genomweiten Screening in den verfügbaren Reissequenzen kein weiterer Locus detektiert wurde. Da der Sequenzvergleich zwischen SORF I und SORF II keine signifikanten

Ähnlichkeiten ergab, ist auch die Entstehung dieser beiden Gene aus einem früheren Duplikationsereignis eher unwahrscheinlich.

Die enge Verwandtschaft von SORF I mit dem wurzelspezifischen *SHR* Gen (Tab. 16, Abb. 12B) lies eine mögliche *gai* Kandidatur bereits im Vorfeld als unwahrscheinlich erscheinen. Dennoch kann festgehalten werden, daß ein *SHR* orthologes Gen oder zumindest ein *SHR*-like Gen mit einem Abstand von nur 0,05 cM proximal vom *gai* Locus in der Gerste vorliegt. Ein Homolog für dieses Gen wurde in der B-EST-Kollektion allerdings nicht gefunden.

SORF III, daß einzige, wenn auch mit einer schwachen Homologie (Tab. 16), direkt als Komponente der GA-Signaltransduktion charakterisierte Reisgen erschien ebenfalls theoretisch als ein eher unwahrscheinlicher Kandidat für *gai*. Da die Anwesenheit der spezifischen GASA Domäne in der vorhergesagten Proteinsequenz vermuten läßt, daß es sich bei SORF III um einen Vertreter der entsprechenden Arabidopsis-Genfamilie handelt. Von GASA-Proteinen wird angenommen, daß sie eher die Zellteilung, als die Zellstreckung regulieren (AUBERT et al. 1998), für das Höhenwachstum ist jedoch die Streckung der Halmzellen wesentlich (ROGERS und ROGERS 1999). Tatsächlich zeigte SORF III in der untersuchten Gerstenregion eine genetische Positionierung, die das Zielgen mit einem 0,5 cM distal flankiert.

Betrachtet man die Positionen von SORF I und III, die in der Gerste genetisch den *gai* Locus und im Reis physisch den aktuellen Kandidaten SORF II flankieren, zusammen mit der Charakterisierung von SORF II als Signaltransduktionsgen, dann könnte SORF II das gesuchte Reisortholog sein. Zumal in der Reisregion zwischen SORF I und III kein weiterer ORF gefunden werden konnte, für den eine Homologie zu Proteinen der Signaltransduktion nachweisbar war. Allerdings sind die entsprechenden Hinweise eher wage und eine endgültige Aufklärung ist nur durch die genetische Lokalisation von SORF II in der Gerste möglich. Diese wurde bisher durch das Fehlen einer signifikant homologen EST-Sonde

erschwert. Erst kürzlich konnte der homologe Weizen-EST CA501242 in der db-EST Datenbank detektiert werden. Damit wurden die deutlich aufwendigeren Bemühungen, eine allelspezifische Sonde aus 'Nipponbare' DNA zu amplifizieren überflüssig (Tab. A5). Sollte CA501242 keinen Polymorphismus zeigen, könnte zumindest versucht werden, an Hand von physisch benachbarten EST-Sonden, in der Gerste die Region um den Kandidaten genetisch zu lokalisieren und im Reis die genomische Zielregion weiter einzugrenzen.

5.2.2 Kartengestützte Isolierung des *gai* Gens

5.2.2.1 Verhältnis genetischer zu physischer Distanzen in der *gai* Region

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind alle Hinweise auf eine mögliche *gai* Kandidatur von SORF II eher ungewiß, zudem konnten bisher keine weiteren Reismarkerkandidaten (Abb. 11) in das Zielintervall S20451 – HZ53O02 / C30454 integriert werden. Somit besteht weiterhin die Möglichkeit, daß auf Grund von Umlagerungen innerhalb der physischen Reisregion kein orthologes Verzweigungsgen gefunden werden kann. Deshalb sollte geprüft werden, in wie weit eine Aussicht besteht, daß Zielgen aus der Gerste zu isolieren. Die Analyse der genetisch – physischen Frequenzen über Translokationsbruchpunkte lokalisierte das GBR0586 (~ S2270) – MWG2287 Intervall um den Genlocus in einer durchschnittlich rekombinanten Region von Chromosom 2HS. Von daher muß in der Gerste mit einem maximalen genetisch – physischen Verhältnis von 4,3 Mb / cM gerechnet werden (KÜNZEL et al. 2000). Allerdings haben Studien in der Vergangenheit immer wieder gezeigt, daß die tatsächlichen Verhältnisse in den untersuchten Genomabschnitten von diesen generellen Betrachtungen abweichen. Entsprechendes wurde für die *rpg4* Region auf dem Gerstenchromosom 5H beobachtet. Für diese Region wurde ein Verhältnis von 1,8 Mb / cM vorrausgesagt, wogegen die anschließende physische Kartierung ein günstigeres Verhältnis von nur 1,0 Mb / cM nachweisen konnte (DRUKA et al. 2000). Aber auch der gegenteilige Effekt konnte beobachtet werden. So zum Beispiel für den *Rar1* Locus

auf dem Gerstenchromosom 2H, für den ein Verhältnis von 1,1 Mb / cM bestimmt wurde, obwohl sich später ein Verhältnis von 12,6 Mb / cM bestätigte (LAHAYE et al. 1998a). Die Gründe für solche Abweichungen liegen in der begrenzten Auflösung der TB-Kartierung, welche die Genauigkeit der Methode einschränken oder aber in Schwankungen innerhalb der mittels TBs definierten Subregionen (DRUKA et al. 2000). Tatsächlich sind Schwankung in den Rekombinationsfrequenzen verschiedener Chromosomenregionen die Regel. Vor allem Region in unmittelbarer Nähe des Zentromers weisen deutlich unterdrückte Rekombinationsfrequenzen auf (PUECHBERTY et al. 1999). So beobachten SMILDE et al. (2001) und HAN et al. (1998) in den proximalen Regionen der Gerstenchromosomen 3H und 7H jeweils eine 30 bzw. 6 - 15fach unterdrückte Rekombinationsfrequenz, verglichen mit den distalen Regionen. Ebenso gibt es deutliche Unterschiede zwischen den codierenden und den nicht codierenden Regionen, wobei Rekombinationsereignisse vorwiegend in den Genregionen auftreten und eher selten in den flankierenden Regionen (KÜNZEL et al. 2000; STEIN et al. 2000; SANDHU et al. 2001). Maximale und minimale Rekombinationsfrequenzen liegen als sogenannte „Hot Spot“ und „Cold Spot“ Subregionen der einzelnen Chromosomen vor (KÜNZEL et al. 2000). Aber selbst innerhalb ein und derselben Genregion wurden deutliche Schwankungen der Frequenzen beobachtet (WEI et al. 1999).

Das bedeutet für die *gai* Region, daß eine endgültige Aussage über die physische Distanz, die dem genetischen Zielintervall von 0,55 cM entspricht, nur getroffen werden kann, wenn ein korrespondierendes YAC- oder BAC-Contig der Gerste identifiziert wird. Oder aber, wenn es z. B. gelingt, mittels einer PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) Southern-Hybridisierung in Kombination mit selten schneidenden Enzymen und flankierenden RFLP-Markern, eine genauere Kenntnis über das tatsächliche Verhältnis genetischer und physischer Distanzen zu erhalten (DESCENZO und WISE 1996; LAHAYE et al. 1998a). Bisher muß für eine geplante 'chromosome walking' Strategie in der Gerste von einer voraussichtlich maximalen physischen Distanz von 2365 kb ausgegangen werden. Auf Grund der eher unterdrückten

Rekombinationsfrequenzen in Zentromernähe, besteht für die untersuchte Chromosomenregion nur wenig Anlaß auf eine tatsächlich deutlich verkürzte physische Distanz zu spekulieren. Nimmt man die, in der Gerste verfügbaren YAC-Banken mit durchschnittlichen Insertgrößen von 160 kb (KLEINE et al. 1993; KLEINE et al. 1997; SCHMIDT 1998) und 480 kb (SIMONS et al. 1997) zum Maßstab, so wären mindestens 5 – 14 YAC-Klone notwendig, um eine den Ziellocus überspannende DNA-Region zu erhalten. Berücksichtigt man dabei die generellen Schwierigkeiten für eine 'chromosome walking' Strategie, die aus der Komplexität des Gerstengenoms mit ca. 80 % repetitiver DNA erwachsen (LUKOWITZ et al. 2000), dann dürfte eine erfolgreiche kartengestützte Klonierung aus der Gerste, basierend auf dem aktuellen Grad der Markerabsättigung, schwierig werden. An die Identifizierung überlappender Gersten-BACs oder die Anwendung der 'chromosome landing' Strategie wäre angesichts der vorausgesagten physischen Distanz noch nicht zu denken.

5.2.2.2 Strategie für eine physische Kartierung des *gai* Gens in der Gerste

Für die Klonierung des *gai* Gens aus der Gerste, ohne die Möglichkeit einer gezielten Suche über ein orthologes Gen aus dem Reis, müßten sicherlich zwei wesentliche Ziele erreicht werden.

Zunächst einmal ist es unabdingbar, das mit 0,5 cM immer noch zu weite *gai* – HZ53O02 / C30454 Intervall mit weiteren Markern abzusättigen, um die theoretisch zu erwartende physische Gerstenregion von 2365 kb deutlich zu verringern. Bisher erwies sich aber keine der untersuchten RFLP-Sonden (R2677, R1245, S2055, C63010), die auf Grund ihrer genetischen Positionen im S2279 – C507171 Intervall der Reiskarte colineare Loci in dieser Region hätten zeigen können, als polymorph. Allerdings stehen noch acht weitere, physisch annotierte Reismarkerkandidaten für weitere Testungen zur Verfügung (Abb. 11). Ebenso könnte die genetische Kartierung des SORF II homologen Weizen-ESTs CA501242, sollte

dieser nicht mit dem *gai* Locus cosegregieren, zumindest eine deutliche Verringerung des Zielintervalls erbringen. Allerdings besteht die Gefahr, daß der Polymorphiegrad der Kartierungspopulation in diesem Bereich eher gering ist, denn Schwankungen von Sequenzpolymorphismen innerhalb definierter genomischer Regionen sind durchaus keine Seltenheit (PETERS 2001).

Gegebenfalls könnten alternative Markertechniken zum Einsatz kommen. Eine mögliche Alternative bietet der Einsatz der 'Amplified Fragment Length Polymorphism' (AFLP)-Markertechnik (VOS et al. 1995). Diese hat sich, kombiniert mit der BSA-Analyse, in früheren Studien als eine effektive Methode für die Markerabsättigung von Zielregionen erwiesen (BECKER et al. 1995; CNOPS et al. 1996; BÜSCHGES et al. 1997; SIMONS et al. 1997). Allerdings offenbarten AFLP-Marker in der Gerste einen geringeren Polymorphiegrad als RFLP-Marker (BECKER und HEUN 1995; BECKER et al. 1995). Zwar läßt sich dieser Nachteil durch die große Anzahl gleichzeitig analysierbarer Fragmente wieder ausgleichen, aber damit ist auch ein hoher Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. So untersuchten LAHAYE et al. (1998a) insgesamt 40.000 AFLP-Fragmente mit 392 Primerkombinationen ohne das 0,7 cM umfassende Zielintervall verringern zu können. Tatsächlich, so kalkulierten die Autoren, müßten 120.000 polymorphe AFLP-Fragmente hinsichtlich einer Kopplung mit dem Zielgen untersucht werden, um Loci innerhalb des Zielintervalls detektieren zu können. Weniger aussichtsreich erscheint der Einsatz der 'Random Amplified Polymorphic DNA' (RAPD) – Markertechnik (SAIKI et al. 1988). Auf Grund der geringen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der dominanten Vererbung sind diese Marker für die Erstellung von Kopplungskarten mit F₂ Populationen oftmals problematisch (SALENTIJIN et al. 1995). Eine weitere Alternative zu den bisher kartierten RFLPs könnte in der Anwendung der 'Single Nucleotid Polymorphism' (SNP)-Markertechnik liegen (ALCALA et al. 1997). Ein möglicher SNP-Kandidat wäre der Gersten-EST BE603344 mit signifikanter Homologie zum Reis-EST R2677 (Tab. 10), der physisch ca. 11 kb distal von SORF II positioniert ist (Abb. 10B). Bisher konnten mittels

BLAST-Analyse der B-EST-Datenbank mit Reissequenzen, die dem genetischen Intervall *gai* – HZ53O02 / C30454 entsprechenden, keine Gersten-ESTs elektronisch in die Zielregion integriert werden. Allerdings kann sich diese Situation auf Grund des stetigen Zuwachs neuer ESTs in der Zukunft ändern. Darüber hinaus sollte auch eine BLAST-Analyse der db-EST-Datenbank vorgenommen werden. Auf diese Weise könnten für eine weitere Markerabsättigung zusätzlich homologe ESTs innerhalb der Zielregion identifiziert werden, da bisher nur Reis-ESTs als mögliche Markerkandidaten verfügbar sind.

Eine Identifikation weiterer genetischer Rekombinanten aus der *gai* Region, erscheint für den Übergang auf die physische Ebene in der Gerste, als notwendiger Schritt. Darüber hinaus können zusätzliche rekombinante Genotypen gegebenenfalls helfen mit *gai* cosegregierende Marker zu überprüfen. TANKSLEY et al. (1995) kalkulierten bei mindestens 3000 meiotischen Ereignissen eine 95 % Wahrscheinlichkeit für ein einzelnes Crossover, das weniger als 0,1 cM vom Zielgen entfernt ist. Im Verlauf der Feinkartierung der *Mlo* Gerstenregion konnten 20 Marker in ein genetisches Intervall von 2,1 cM integriert werden, was einer Markerdichte von einem Marker pro 0,1 cM entspricht. Hierfür wurde eine Kartierungspopulation von 2000 F₂ Pflanzen eingesetzt, die eine 98 % Chance bietet für das Auftreten von Rekombinanten innerhalb einer 0,1 cM Distanz zum Zielgen (BÜSCHGES et al. 1997; SIMONS et al. 1997). Aktuell liegt diese Wahrscheinlichkeit für die 'Hv287' x 'Monte Christo' Kartierungspopulation mit 1888 Gameten allerdings nur bei 85 %. (Diese Kalkulation setzt voraus, daß die Wahrscheinlichkeit für das Ausbleiben einer Rekombination zwischen einem 0,1 cM entfernten Marker und dem *gai* Locus bei 0,999 pro Meiose liegt. Deshalb liegt diese Wahrscheinlichkeit für 1888 Meiosen bei $0,999^{1888} = 0,15$; und dementsprechend die Wahrscheinlichkeit für eine Rekombination bei $1 - 0,15 = 0,85$).

Für die *gai* Region müßte allerdings, nach aktuellem Stand der Erkenntnisse, eine genetische Karte mit einer Auflösung von 0,025 erstellt werden, um mit flankierenden Markern eine entsprechend reduzierte genomische Gerstenregion (ca. 215 kb) detektieren zu können. So

wurden für die physische Lokalisation der Gerstenresistenzgene *Mla* (WEI et al. 1999) und *Rar1* (LAHAYE et al. 1998a; 1998b) jeweils 1800 und 4310 F₂ Individuen untersucht, um die für die Markerabsättigung und physische Kartierung erforderlichen genetischen Auflösungen von 0,03 und 0,012 cM zu erhalten. Erst dann ermöglichten cosegregierende und / oder ausreichend eng gekoppelte Marker die Identifikation überschaubarer YAC-Contigs. Über die anschließende Verwendung dieser YACs als weitere Markerquellen, konnten schließlich physische Zielregionen von 120 und 240 kb definiert werden.

Die Erweiterung der vorhandenen hochauflösenden Population auf ca. 2000 F₂ Individuen könnte ebenfalls an Hand der im Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Strategie erfolgen. Für den Nachweis von *gai* gekoppelten Rekombinationsereignissen innerhalb der erweiterten Kartierungspopulation stehen bereits zwei PCR-gestützte Marker, sGBR0586 und sMWG2287, zur Verfügung (Tab. A10). Zudem ist aus dem im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Pflanzenmaterial noch ausreichend F₄ Saatgut für eine entsprechende Ergänzung der 'Hv287' x 'Monte Christo' Population vorhanden (BÖRNER, pers. Mittl.).

Der finale Beweis der Genisolation über Komplementation ist für Gerstenpflanzen immer noch problematisch, weil bisher noch kein effizientes Transformationssystem etabliert werden konnte. Zwar stellt der Gentransfer in der Gerste heute keine unüberwindliche Hürde mehr dar, allerdings gibt es keine standardisierten Transformationsparameter, die uneingeschränkt auf alle Gerstensorten übertragen werden können (IGLESIAS et al. 1997; HARWOOD et al. 2000).

Die abschließende Untersuchung des klonierten *gai* Gens wird zusätzlich erschwert, da die ursprüngliche Wildtyp-Variante, 'M.C. 20 (Mutante de Cebada, d.h. Gerstenmutante)' (Absch. 3.1.1) nicht mehr ermittelt werden kann (BÖRNER, pers. Mittl.). Somit wird eine mögliche Strategie, wie sie für die Komplementation des *HvSPY* Gens besprochen wurde (ROBERTSON et al. 1998), nämlich über die Transformation der intakten Variante des *gai* Gens

in die Mutante 'Hv287', dahingehend beeinträchtigt, daß der Erfolg des Experiments, die Wiederherstellung des ursprünglichen Wuchstypen, nicht unmittelbar durch einen Vergleich mit dem Wildtypen erfolgen kann. Gleiches gilt für den Einsatz von Strategien, die auf eine Inaktivierung des *gai* Gens in der Wildtyp-Variante abzielen könnten, wie z.B. die, für Komplementationsversuche in der Gerste interessante TILLING Strategie. Denkbar wäre allerdings eine Transformation des intakten *gai* Gens in die 'Hv287' Mutante, in diesem Fall könnte die Komplementation an Hand des normalwüchsigen Phänotypen und der wiederhergestellten GA-Sensitivität der transgenen 'Hv287' Pflanze erfolgen. Sollte für *gai* ein orthologes Gen aus dem Reis nachgewiesen werden, könnte über eine Nutzung des entwickelten Transformationssystems der Reispflanze nachgedacht werden.

5.2.2.3 Züchterische Nutzung

Die Frage, ob die *gai* Mutation ein geeigneter Kandidat für den Einsatz in der Pflanzenzüchtung wäre, vergleichbar den *Rht*-Genen des Weizens, kann an dieser Stelle noch nicht beurteilt werden, da entsprechende Untersuchungen des Ertragsindex noch nicht durchgeführt worden sind. Somit ist über möglicherweise vorhandene, ertragsfördernde pleiotrope Effekte der *gai* Mutation noch nichts bekannt. Allerdings beobachteten HOPP et al. (1981) für die ursprüngliche *gai* Mutante 'M.C. (Mutante de Cebada) 90' eine photoperiodische Insensitivität und eine reduzierte Sensitivität gegenüber Temperatur- und Umweltschwankungen. Zudem betonten sie die grundsätzliche Ähnlichkeit, die zwischen der *gai* Mutation der Gerste und der *Rht* Mutation der Weizensorte 'Norin' besteht, allerdings ohne diese weiter zu konkretisieren.

Ein weiteres wesentliches Kriterium für den züchterischen Einsatz dürfte der Grad der reduzierten Wuchshöhe sein. Auch hierüber liegen aktuell keine Meßdaten der durchschnittlichen Wuchshöhe von 'Hv287' Pflanze vor. Dennoch ist die *gai* Mutation eher als Halbverzweigungstyp zu bezeichnen, verglichen mit der im Durchschnitt nur 35 cm hohen

und deshalb extrem verzwerten GA-sensitive *gal* Mutante 'Hv288' (BÖRNER et al. 1999). Einen Eindruck von der Wuchshöhe des 'Hv287' Phänotypen kann die, in Abbildung 2 gezeigte Gegenüberstellung mit dem 'Monte Christo' Phänotypen (\varnothing 95 cm) vermitteln. Die durchschnittlichen Verzweigungsgrade der unterschiedlichen *Rht*-Allele können allerdings den Rahmen abstecken, indem sich eine züchterisch relevante Halmverkürzung bewegen sollte. So ergaben Messungen isogener *Rht-B1b* und *Rht-D1b* Linien eine durchschnittliche Reduktion der Wuchshöhe um 18 %, wogegen *Rht-B1c* Linien mit einer um 50 % reduzierten Wuchshöhe vielen Züchtern bereits als zu extrem verzwert galten (FLINTHAM et al. 1997).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das in der Gibberellin (GA)-insensitiven Gerstenmutante 'Hv287' identifizierte rezessive Verzweigungsgen *gai* ist auf dem Chromosom 2HS in unmittelbarer Nähe zum Zentromer lokalisiert. GA-insensitiven Zwergmutanten weisen einen Defekt in der GA-Kontrolle des Halmwachstums auf, entweder in der Signalerkennung oder in einer der Regulatorkomponenten in der Signaltransduktion. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in der hochauflösenden Kartierung und Markerabsättigung der *gai* Region. Damit sollte die Voraussetzung für eine kartengestützte Klonierung des Gens geschaffen werden.

Die Feinkartierung der *gai* Region erfolgte in einer aus 944 F₂ Individuen bestehenden Population der Kreuzung 'Monte Christo' x 'Hv287'. Gestützt auf Beobachtungen aus früheren Studien über konservierte Markeranordnungen und über orthologe Beziehungen GA-insensitiver Gene zwischen unterschiedlichen Gräsergenomen im allgemeinen und zwischen den Genomen von Gerste und Reis im besonderen, wurde eine syntäniebasierte Strategie gewählt. Diese erlaubte einen kombinierten Einsatz aller verfügbaren Instrumente und Ressourcen der Gerste und der zum Gräsermodell avancierten Reispflanze. Hierzu gehören die genetischen Karten und EST-Datenbanken beider Genome, sowie die genetisch integrierten physischen Karten und Sequenzstrukturdaten des Reisgenoms.

Durch einen Vergleich genetischer Gersten- und Reiskarten konnte eine 11,8 cM umspannende syntäne Region in der RGP-Kopplungskarte des Reischromosoms 7L theoretisch identifiziert und durch die Integration von sieben Reismarkern in die genetische Gerstenkarte verifiziert werden.

Basierend, auf der beobachteten Colinearität zwischen beiden genetischen Regionen wurden korrespondierende Reis-Contigs in den genetisch integrierten YAC- und BAC- / PAC-Karten identifiziert. Über das YAC-Contig wurden drei zusätzliche Marker für die *gai* Region verfügbar, von denen die Marker S20451 und C30454 in der Gerste das genetische Zielintervall (0,55 cM) und im Reis, durch elektronisches 'chromosome walking', die vier

BAC-Klone umfassende physische Zielregion definieren. Deren Sequenzstrukturdaten (RiceGAAS) offenbarten drei putative Signaltransduktions-ORFs (SORF I, II und III). Die in BLAST-Analysen detektierten homologen Weizen-ESTs BG608073 / BG314153 (SORF I) und der Gersten-EST HZ53O02 (SORF III) wurden in die hochauflösende Karte der Zielregion integriert. Für eine mögliche *gai* Kandidatur des verbleibenden Reis-ORFs (SORF II) spricht die physische Position zwischen SORF I und III, die in der Gerste das *gai* Gen flankieren und die nachgewiesene Charakterisierung des vorhergesagten Genprodukts als Transkriptionsregulator der GRAS-Proteinfamilie.

Die vorliegende, vergleichende Studie zwischen Gerste und Reis für die *gai* Region zeigt eine stabile orthologe Beziehung, basierend auf der Integration von 10 Reis-EST-Markern aus der genetischen und von zwei putativen Reisgenen ('*SHR-like*' und '*GA-regulated*') aus der physischen (~224 kb) Zielregion im Reis. Für die weitere Feinkartierung der *gai* Region wurden zusätzlich acht physisch lokalisierten Reis-EST-Sonden (RGP) als Markerkandidaten vorselektiert.

6 SUMMARY

The recessive gibberellin (GA)-insensitive dwarfing gene *gai* of the barley mutant 'Hv287' is located in the centromere region of chromosome 2HS. GA-insensitive mutants are affected in their GA-response controlling plant height, whether in the perception or in some transcription regulator compound of the signal pathway. The main emphasis of the present work was to develop a high resolution map and to achieve a marker saturation of the *gai* region, as a precondition for the map-based cloning of this gene.

Fine mapping of the *gai* region was performed in a 'Monte Christo' x 'Hv287' population of 944 F₂ plants. Based on observations from previous studies regarding the conserved marker order and the orthologous relationships between GA-insensitive genes across grass genomes generally and between the genomes of barley and rice in particular, a synteny-based strategy was chosen. This strategy allowed an combined use of available instruments and resources of barley and rice. Those include genetic maps and EST databases of both genomes, as well the genetic integrated physical maps and sequence data of the rice genome.

Comparing the barley and rice genetic linkage maps, it was possible to identify theoretically a 11,8 cM spanning syntenic region in the RGP rice map of chromosome 7L and finally, to confirm this synteny by integrating seven rice markers into the barley genetic map.

Based on the observed colinearity between both genetic regions a corresponding rice contig was identified in the available YAC and BAC / PAC maps. The analysis of the defined YAC contig led to the detection of three new YAC originated rice markers for the *gai* region. Out of these, the markers S20451 and C30454 could define the final target interval (0,55 cM) in barley, and by electronic chromosome walking the genomic target region consisting of four rice BAC clones.

Three putative open reading frames (SORF I - III) were identified in the rice sequence data exhibiting significant sequence similarity to known signal transduction genes. Using BLAST analysis the homologous wheat ESTs BG608073 / BG314153 (SORF I) and the barley EST

HZ53O02 (SORF III) were detected and could be integrated into the high-resolution map of barley. Reasons for a supposed *gai* candidature of the remaining rice ORF (SORF II) are its physical position between SORF I and III in rice, which flank the *gai* gene in the barley genetic map, and the demonstrated characterisation of its deduced protein as a GRAS family transcription regulator.

The present, comparative study between barley and rice in the *gai* region revealed a stable orthologous relationship, based on the integration of 10 rice EST markers of the genetic and two putative rice genes ('*SHR-like*' und '*GA-regulated*') of the physical (~224 kb) rice target region. For a further fine mapping additional eight physically assigned rice EST probes (RGP) were preselected as marker candidates.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahn SN and Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7980-7984
- Ahn SN, Anderson JA, Sorrels ME and Tanksley SD (1993) Homologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genet* 241: 483-490
- Akashi H, Miyagishi M, Taira K (2001) Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nuc Acid Drug Dev* 11: 359-367
- Alcala J, Giovannoni JJ, Pike LM, Reddy AS (1997) Application of genetic bit analysis (GBA) for allelic selection in plant breeding. *Molecular Breeding* 3: 495-502
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Amador V, Monte E, Gracia-Martinez J-L, Prat S (2001) Gibberellins signal nuclear import PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila* armadillo. *Cell* 106 : 343-354
- Arumuganathan und Earle (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* 9: 229-233
- Ashikari M and Matsuoka M (2002) Application of rice genomics to plant biology and breeding. *Bot Bull Acad Sin* 43: 1-11
- Ashikari M, Wu J, Yano M, Sasaki T, Yoshimura A. (1999) Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the -subunit of GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10284-89
- Aubert D, Chevillard M, Dorne A-M, Arlaud G, Herzog M (1998): Expression patterns of GASA genes in *Arabidopsis thaliana*: the GASA4 gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Mol Biol* 36: 871-883
- Austin RB, Bingham J, Blackwell RD, Evans LT, Ford MA, Morgan CL, Taylor M (1980) Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. *J Agric Sci Camb* 94: 675-689
- Bailey PC, McKibbin RS, Lenton JR, Holdsworth MJ, Flintham JE and Gale MD (1999) Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice. *Theor Appl Genet* 98: 281-284
- Ballvora A, Pierre M, Van der Ackerveken G, Schornack S, Rossier O, Ganal M, Lahaye T, Bonas U (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato Bs4 locus, governing

- recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol Plant Micorbe Interact* 14: 629-638
- Barakat A, Carels N, Bernardi G (1997) The distribution of genes in the genomes of Graminae. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6857-6861
- Barry G (2001) The use of the Monsanto draft rice genome sequence in resarch. *Plant Physiol* 125: 1164-1165
- Becker J, Heun M (1995) Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol Biol* 27: 835-845
- Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, Heun M (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 249: 65-73
- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser M-T, Aeschbacher RA (1993) Root development in *Arabidopsis*: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57-70
- Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc London Ser B* 274: 227-274
- Bennetzen JL (2000) Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: Microcolinearity and its many exceptions. *Plant Cell* 12: 1021-1030
- Bennetzen JL, SanMiguel P, Chen M, Tikhonov A, Francki M, Avramova Z (1998) Grass genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1975-1978
- Bennetzen JL (1997) The evolution of grass genome organisation and function. *The Society for Experimental Biology SEB 1027* :123-126
- Bennetzen JL, Freeling M (1997) The Unified Grass Genome: Synergy and Synteny. *Genome Research* 7:301-306
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler D (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res* 30: 17-20
- Bethke PC, Jones RL (1998) Gibberellin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 1: 440-46
- Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R, Delseny M (2000) Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Cell* 12: 1093-1101
- Bolle C, Koncz C, Chua N-H (2000) PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* 14: 1269-1278
- Börner A, Korzun V, Malyshev S, Ivandic V, Graner A (1999) Molecular mapping of two dwarfing genes differing in their GA response on chromosome 2H of barley. *Theor Appl Genet* 99: 670-675
- Börner A, Korzun V, Worland AJ (1998) Comparative genetic mapping of loci affecting plant height and development in cereals. *Euphytica* 100: 245-248

- Börner A, Röder M, Korzun V (1997) Comparative molecular mapping of GA insensitive Rht loci on chromosomes 4B and 4D of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 95: 1133-1137
- Börner A, Plaschke J, Korzun V, Worland AJ (1996) The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye. *Euphytica* 89: 69–75
- Börner A, Korzun V (1995) Genetical studies of two barley mutants differing in their GA response. *Barley Genet Newsl* 25: 27-29
- Börner A, Worland AJ, Plaschke J, Schumann E, Law CN (1993) Pleiotropic effects of genes for reduced height (*Rht*) and day-length insensitivity (*Ppd*) on yield and its components for wheat grown in middle Europe. *Plant Breeding* 111: 204-216
- Börner A, Lehmann CO, Mettin D (1987) Preliminary results of a screening for GA₃ response in wheats of the Gatersleben gene bank. *Kulturpflanze* 35: 179-186
- Bonierbale MD, Plaisted RL, Tanksley SD (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103
- Bonnema G, Hontelez J, Verkerk R, Zhang YQ, Vandaelen R, Vankammen A, Zabel P (1996) An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant J* 9: 125-133
- Brueggeman R, Rostoks N, Kundra D, Killian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B and Kleinhofs A (2002) The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1-6
- Brunner S, Keller B, Feuillet C (2000) Molecular mapping of the Rph7.g leaf rust resistance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 101: 783-788
- Büsches R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, et al. (1997) The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Burke DT, Carle GF, Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812
- Burr B (2002) Mapping and Sequencing the rice genome. *The Plant Cell* 14: 521-523
- Carels N, Barakat A, Bernardi G (1995) The gene distribution of the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995: 11057-11060
- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao Z, Yu Z, Roland PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274
- Cartinhour SW (1997) Public informatics resources for rice and other grasses. *Plant Mol Biol* 35: 241-251

- Chandler PM, Marion-Poll A, Gubler F (2002) Mutants at the *Slender 1* locus of Barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol* 129: 181-190
- Chandler PM, Robertson M (1999) Gibberellin dose-response curves and the characterization of dwarf mutants in barley. *Plant Physiol* 120: 623-632
- Chen M, Presting G, Barabazuk WB, Goicoechea JL, Blackmon B, Fang G, Kim H, Frisch D, Yu Y, Sun S, et al. (2002) An integrated physical and genetic map of the rice genome. *The Plant Cell* 14: 537-545
- Chen M, SanMiguel P, Oliveira ACd, Woo S-S, Zhang H, Wing RA, Bennetzen JL (1997) Microcolinearity in *sh2*-homologous regions of the maize, rice, and sorghum genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3431-3435
- Chen L, Marmey P, Taylor NJ, Brizard JP, Espinosa C, D'Cruz P, Huet H, Zhang S, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM (1998a) Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat Biotechnol* 16: 1060-1064
- Chen XM, Line RF, Leung H (1998b) Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor Appl Genet* 97: 345-355
- Cheng Z, Presting GG, Buell CR, Wing RA, Jiang J (2001) Integration of genetic and cytogenetic maps reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* (in press)
- Choi S, Creelman R, Mullet JE, Wing RA (1995) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep* 13: 124-128
- Chory J, Wu D (2001) Weaving the Complex Web of Signal Transduction. *Plant Physiol* 125: 77-80
- Cnops G, den Boer B, Gerats A, Van Montagu M, Van Lijsebettens M (1996) Chromosome landing at the *Arabidopsis Torando1* locus using AFLP-based strategie. *Mol Gen Genet* 253: 32-41
- Civardi L, Xia Y, Edwards KJ, Schnable PS, Nikolau BJ (1994) The relationship between genetic and physical distances in the cloned *a1-sh2* interval of the *Zea mays* L. genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8268-8272
- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001) High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* 126: 480-484
- Collins FS (1992) Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1: 3-6
- Cowling RJ, Kamiya Y, Seto H, Harberd NP (1998) Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 117:1195-203

- Creusot F, Fouilloux E, Dron M, Lafleuriel J, Picard G, Billaut A, Paslier DL, Cohen D, Chabouté M-E, Durr A, et al. (1995) The CIC library: a large insert YAC library for genome mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8: 763-770
- Danesh D, Penuela S, Mudge J, Denny R, Nordstrom H, Martinez J, Young N (1998) A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theor Appl Genet* 96: 196-202
- Davies PJ (1995) *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Dehal P, Predki P, Olsen AS, Kobayashi A, Folta P, Lucas S, Land M, Terry A, Ecale Zhou CL, Rash S, et al. (2001) Human Chromosome 19 and Related Regions in Mouse: Conservative and Lineage-Specific Evolution. *Science* 292: 104-111
- Devos KM, Gale MD (2000) Genome relationships: The grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637-646
- Devos KM, Beales J, Nagamura Y, Sasaki T (1999) Arabidopsis-rice: will colinearity allow gene prediction across the eudicot-monocot divide? *Genome Res* 9: 825-829
- Devos KM, Gale MD (1997) Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Biol* 35: 3-15
- Devos KM, Chao S, Li QY, Simonetti MC, Gale MD (1994) Relationship between chromosome 9 of maize and wheat homeologous group 7 chromosomes. *Genetics* 138: 1287-1292
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Francis HA, Harcourt RL, Koebner RMD, Liu CJ, Masojc P, Xie DX, Gale MD (1993) Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor Appl Genet* 85: 673-680
- DeScenzo R, Wise RP (1996) Variation in the ratio of physical to genetic distance in intervals adjacent to the *Mla* locus on barley chromosome 1. *Mol Gen Genet* 251: 472-482
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benefey PN (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86: 423-433
- Dill A, Sun T-p (2001) Synergistic de-repression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777-785
- Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG (1996) The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional encoding leucine-rich proteins. *Cell* 84: 451-459
- Doggett NA, Goodwin LA, Tesmer JG, Meincke LJ, Bruce DC, Clark LM, Altherr MR, Ford AA, Chi H-C, Marrone BL, et al. (1995) An Integrated Physical Map of Human Chromosome 16. *Nature* 377: 335-365
- Draye X, Lin Y-R, Qian X-y, Bowers JE, Burow GB, Morrell PL, Peterson DG, Presting G, Ren S-x, Wing RA, Paterson AH (2001) Toward integration of comparative genetic, physical,

diversity, and cytomolecular maps for grasses and grain, using the Sorghum genome as a foundation. *Plant Physiol* 125: 1325-1341

Druka A, Kudrna D, Han F, Kilian A, Steffenson B, Frisch D, Tomkins J, Wing R, Kleinohfs A (2000) Physical mapping of the barley stem rust resistance gene *rpg4*. *Mol Gen Genet* 264: 283-290

Dubcovsky J, Ramakrishna W, SanMiguel PJ, Busso CS, Yan L, Shiloff BA, Bennetzen JL (2001) Comparative sequence analysis of colinear barley and rice bacterial artificial chromosomes. *Plant Physiol* 125: 1342-1353

Dubcovsky J, Lou M-C, Zhong GY, Bransteitter R, Desai A, Kilian A, Kleinohfs A, Dvorák J (1996) Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L.. *Genetics* 143: 983-999

Dunford RP, Yano M, Kurata N, Sasaki T, Huestis G, Rocheford T, Laurie DA (2002) Comparative Mapping of the barley *Ppd-H11* photoperiod response gene region, which lies close to a junction between two rice linkage segments. *Genetics* 161: 825-834

Dunford R, Vilageliu L, Moore G (1993) Stabilization of a yeast artificial chromosome containing plant DNA using a recombination-deficient host. *Plant Mol Biol* 21: 1187-1189

Eckardt NA (2001) Everything in its place: Conservation of gene order among distantly related plant species. *Plant Cell* 13: 723-725

Eckardt NA (2000) Meeting Report: Sequencing the rice genome. *Plant Cell* 12: 2011-2017

Edwards KJ, Thompson H, Edwards D, de Saizieu A, Sparks C, Thompson JA, Greenland AJ, Evers M, Schuch W (1992) Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing three haploid maize genome equivalents. *Plant Mol Biol* 19: 299-308

Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of interrupted helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237

Ellis RP, Forster BP, Waugh R, Bonar N (1997) Mapping physiological traits in barley. *New Phytol* 137: 149

Fang Y-D, Akula Ch, Altpeter F (2002) *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare*) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA : barley genomic DNA junctions. *J Plant Physiol* 159: 1131-1138

Favret EA, Favret GC, Malvarez EM (1975) Genetic regulatory mechanisms for seedling growth in barley. In: *Barley Genet III Proc Third Intl Barley Genet Symp*, Garching, Germany, pp 37-42

Fedoroff N (2000) Transposons and genome evolution in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7002-7007

- Feuillet C, Penger A, Gellner K, Mast A, Keller B (2001) Molecular evolution of receptor-like kinase genes in hexaploid wheat: independent evolution of orthologs after polyploidization and mechanisms of local rearrangements at paralogous loci. *Plant Physiol* 125: 1304-1313
- Feuillet C, Keller B (2002) Comparative genomics in the grass family: Molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Annals of Botany* 89: 3-10
- Feuillet C, Keller B (1999) High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. *Plant Biology* 96: 8265-8270
- Feuillet C, Schachermayr G, Keller B (1997) Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat. *Plant J* 11: 45-52
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock Ch (2002) Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *Plant Cell* 14: 15-45
- Fischer R, Balmukand B (1928) The estimation of linkage from offspring of selfed heterozygotes. *J Genet* 20: 309-368
- Flintham JEF, Börner A, Worland AJ, Gale MD (1997) Optimising wheat grain yield: effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J Agric Sci* 128: 11-25
- Foote T, Roberts M, Kurata N, Sasaki T, Moore G (1997) Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the *Ph1* locus in wheat. *Genetics* 147: 801-807
- Foster CA. (1977) Slender: an accelerated extension growth mutant of barley. *Barley Genet Newsl* 7: 24-27
- Freeling M (2001) Grasses as a single genetic system. Reassessment 2001. *Plant Physiol* 125: 1191-1197
- Fridborg I, Kuusk S, Robertson M, Sundberg E (2001) The Arabidopsis Protein SHI Represses Gibberellin Responses in Arabidopsis and Barley. *Plant Physiol* 127: 937-948
- Fridborg I, Kuusk S, Moritz T, Sundberg E (1999) The arabidopsis dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell* 11: 1019-1031
- Fu X, Sudhaker D, Peng J, Richards DE, Christou P, Harberd NP (2001) Expression of Arabidopsis GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses. *Plant Cell* 13: 1791-1802
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Katsumi M, Phinney BO, Gaskin P, MacMillan J, Takahashi N (1988) The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (*D8*) of maize accumulates native gibberellins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9031-9035
- Fujisawa Y, Kato T, Ohki S, Ishikawa A, Kitano H, et al. (1999) Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc. Natl Acad Sci USA* 96: 7575-80

- Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. Proc Natl Acad Sci USA 95: 1971-1974
- Gale MD, Atkinson MD, Chinoy CN, Harcourt RL, Jia J, Li QY, Devos KM (1995) Genetic Maps of Hexaploid Wheat. Proceedings of the 8th International Wheat Genetics Symposium, China Agricultural Sciencetech Press, Beijing, China (Li ZS & Xin ZY eds.). pp. 29-40
- Gale MD and Youssefian S (1985) Dwarfing genes in wheat. In Progress in Plant Breeding, ed GE Russel, Butterworths, London, UK, pp. 1-25
- Gale MD und Marshall GA (1976) The chromosomal location of Gai1 und Rht1 genes for gibberellin insensitivity and semi-dwarfism, in a derivate of Norin 10 wheat. Heredity 37: 283-289
- Gale MD, Law CN, Marshall GA, Worland AJ (1975). The genetic control of gibberellic acid insensitivity in a "dwarf" wheat. Heredity 34: 393-99
- Gallego F, Feuillet C, Messmer M, Penger A, Graner A, Yano M, Sasaki T, Keller B (1998) Comparative mapping of two wheat leaf rust resistance loci *Lr1* and *Lr10* in rice and barley. Genome 41: 328-336
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Boyko EV (1996a) Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. Genetics 143: 1001-1012
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Taylor T (1996b) Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. Genetics 144: 1883-1891
- Giovannoni JJ, Wing RA, Ganai MW, Tanksley SD (1991) Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. Nucleic Acids Res 19: 6553-6558
- Goff SA, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, et al. (2002) A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296: 92-100
- Goff SA (1999) Rice as a model plant for cereal genomics. Current Opinion in Plant Biology 2: 86-89
- Gómez-Cadenas A, Zentalla R, Walker-Simmons M, Ho T-HD (2001) Gibberellin / abscisic acid antagonism in barley aleuron cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. Plant Cell 13: 667-679
- Graebe JE (1987) Gibberellin biosynthesis and control. Annu Rev Plant Physiol 38: 419-465
- Graner A, Altschmied L (2001) Gerste – Ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. GENOMXPRESS 3 / 01: 3-9
- Graner A, Bauer E, Kellermann A, Kirchner S, Muraya JK, Jahoor A, Wenzel G (1994) Progress of RFLP-map construction in winter barley. Barley Genet Newsl 23: 53-59

- Graner A, Bauer E, Kellermann A, Kirchner S, Muraya K, et al. (1993) Progress of RFLP-map construction in winter barley. *Barley Genet Newslett* 23: 53-59
- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G and Herrmann RG (1991) Construction of an RFLP map in barley. *Theor Appl Genet* 83:250-256
- Greenblatt IM, Brink RA (1962) Twin mutations in medium variegated pericarp maize. *Genetics* 47: 489-501
- Greene EA, Codomo ChA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner Ch, Johnson JE, Odden AR (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 731-740
- Grill E, Somerville C (1991) Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library of *Arabidopsis* which is suitable for chromosome walking. *Theor Appl Genet* 226: 484-490
- Gubler F, Chandler P, White RG, Llewellyn DJ, Jacobsen JV (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol* 129: 191-200
- Gubler F, Raventós D, Keys M, Watts R, Mundy L, Jacobsen JV (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant J* 17: 1-9
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: Evidence for Myb transactivation of a high-pI-amylase gene promoter. *Plant Cell* 7: 1879-1891
- Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T, Murfett J (1998) How does auxin turn on genes? *Plant Physiol* 118: 341-347
- Guo H-S, Fei J-F, Xie Q, Chua N-H (2003) A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant J* 34: 383
- Hagio T, Hirabayashi T, Machii H, Tomotsume H (1995) Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports* 14: 329-334
- Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273: 669-672
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 575-607
- Han F, Kilian A, Chen JP, Kundrna D, Steffenson B, Yamamoto K, Matsumoto T, Sasaki T, Kleinhofs A (1999) Sequence analysis of a rice BAC covering the syntenous barley *Rpg1* region. *Genome* 42: 1071-1076
- Han F, Kleinhofs A, Ullrich SE, Kilian A, Yano M, Sasaki T (1998) Synteny with rice: Analysis of barley malting quality QTLs and *rpg4* chromosome regions. *Genome* 41: 373-380
- Harberd NP, King KE, Carol P, Cowling RJ, Peng J, Richards DE (1998) Gibberellin: Inhibitor of an inhibitor of ... ? *BioEssays* 20: 1001-1008

- Harberd, NP, Freeling, M (1989) Genetics of dominant gibberellin-insensitive dwarfism in maize. *Genetics* 121: 827-838
- Hart G (1995) Genome analysis in the Triticeae using isozymes. In *Methods of Genome Analysis in Plants*, PP. Jahoor ed, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 195-209
- Hart GE (1987) Genetic and biochemical studies of enzymes. In *Wheat and Wheat Improvement*, Ed 2, Vol. 13, EG Heyne ed, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 199-214
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin S, Antonio BA, Parco A, et al. (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* 148: 479-494
- Harwood WA, Ross SM, Cilento P, Snape JW (2000) The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111: 67-76
- Havukkala IJ (1996) Cereal genome analysis using rice as a model. *Current Opinions in Genetics Dev* 6: 711-714
- Hedden P (2003) The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* 19: 5-9
- Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523-530
- Hedden P, Kamiya Y (1997) Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 431-460
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M-T, Benefey PN (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* 101: 555-67
- Henikoff S, Henikoff JG, Alford WJ, Pietrokovski S (1995) Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene* 163: GC17-GC26
- Heun M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrells ME, Tanksley SD (1991) Construction of a restriction fragment length polymorphism map of barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447
- Hoogendorn J, Gale MD (1988) The effect of dwarfing genes on heat tolerance in CIMMYT germplasm. In: *Cereal Breeding Related to Integrated Cereal Production*, eds ML Jorna, LAJ Sloodmaker, Pudoc, Wageningen, pp 61-66
- Hooley R (1994) Gibberellins: Perception, transduction and response. *Plant Mol Biol* 26:1529-1555
- Hopp HE, Favret GC, Favret EA (1981) Pleiotropic effects of a dwarfing gene causing insensitivity to gibberellin on some key enzymes. In: *Barley Genetics IV, Proc Fourth Intl Barley Genet Symp*, Edinburgh, pp 544-549

- Horvath H, Rostoks N, Brueggeman R, Steffenson B, von Wettstein D, Kleinhofs A (2003) Genetically engineered stem rust resistance in barley using the *Rpg1* gene. Proc Natl Acad Sci USA 100: 364-369
- Iglesias VA, Moscome EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke M, Matzke AJM (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. Plant Cell 9: 1251-1264
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J (2001) *Slender* rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. Plant Cell 13: 999-1010
- Islam AKMR, Shepherd KW, Sparrow DHB (1981) Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. Heredity 46: 161-174
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE 1 in nuclei. Plant Cell 14: 57-70
- Izawa T and Shimamoto (1996) Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. Trends Plant Sci 1: 95-99
- Izhaki A, Swain SM, Tseng T-s, Borochoy A, Oszewski NE, Weiss D (2001) The role of SPY and its TRR domain in the regulation of gibberellin action throughout the life cycle of *Petunia hybrida* plants. Plant J 28: 1-8
- Jacobsen SE, Binkowski KA, Olszewski NE (1996) SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9292-96
- Jacobsen, SE, Olszewski NE (1993) Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. Plant Cell 5: 887-896
- Jiang J, Gill BS, Wang GL, Roland PC, Ward DC (1995) Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of rice genome with bacterial artificial chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4487-4491
- Jones DA, Jones IDG (1997) The roles of leucine-rich repeats in plant defense. Adv Bot Res Adv Plant Pathol 24: 89-167
- Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc Natl Acad Sci USA 93: 11746-11750
- Keller B, Feuillet C (2000) Colinearity and gene density in grass genomes. Trends in Plant Science 6: 246-251
- Kende H, Zeevaart JAD (1997) The five "classical" plant hormones. Plant Cell 9: 1197-1210

- Kilian A, Chen J, Han F, Steffenson B, Kleinhofs A (1997) Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol Biol* 35: 187-195
- Kilian A, Kudrna DA, Kleinhofs A, Yano M, Kurata N, Steffenson B, Sasaki T (1995) Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley *Rpg1* region. *Nucleic Acids Res* 23: 2729-2733
- Kishimoto N, Higo H, Abe K, Arai S, Saito A, Higo K (1994) Identification of the duplicated segments in rice chromosomes 1 and 5 by linkage analysis of cDNA markers of known functions. *Theor Appl Genet* 88: 722-726
- Kleine M, Michalek W, Diefenthal T, Dargatz H, Jung C (1997) Construction of a *Mlu*-YAC library from barley (*Hordeum vulgare* L.) and analysis of YAC insert terminal regions. *Genome* 40: 896-902
- Kleine M, Michalek W, Graner A, Hermann RG, Jung C (1993) Construction of a barley (*Hordeum vulgare* L.) YAC library and isolation of a *Hor-1*-specific clone. *Mol Gen Genet* 240: 265-272
- Kleinhofs A, Kilian A, Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Hayes P, Chen FQ, Lapitan N, Fenwich A, Blake TK, Kanazin V, et al. (1993) A molecular, isozyme and morphological map of barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor Appl Genet* 86: 705-712
- Koornneef M, Elgersma A, Hanhart CJ, Van Loenen-Martinet EP, Van Rijn L, Zeevaart JAD (1985) A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 65: 33-39
- Koprek T, Hänsch R, Nerlich A, Mendel RR, Schulz J (1996) Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Sci* 119: 79-91
- Koprek T, McElroy D, Louwense J, Whilliams-Carrier RE, Lemaux PG (2000) An efficient method for dispersing Ds elements on the barley genome as a tool for determining gene function. *Plant J* 24: 253-263
- Koprek T, Rangel S, McElroy D, Louwense J, Whilliams-Carrier RE, Lemaux PG (2001) Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. *Plant Physiol* 125: 1345-1362
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175
- Kota R, Wolf M, Michalek W, Graner A (2001) Application of denaturing high-performance liquid chromatography for mapping of single nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Genome* 44: 523-528
- Kovtun Y, Chiu W-L, Zeng W, Sheen J (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395: 716-720

- Kowalski SP, Lan TH, Feldmann KA, Paterson AH (1994) Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved organization. *Genetics* 138: 499-510
- Kumar LS, Gupta VS, Ranjekar PK (1990) Identification and partial characterization of two species-specific repeat families in the great millet (*Sorghum vulgare*, Poaceae) genome. *Plant Syst Evol* 171: 249-257
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397-412
- Kurata N, Umehara Y, Tanoue H, Sasaki T (1997) Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Mol Biol* 35: 101-113
- Kurata N, Moore G, Nagamura Y, Foote T, Yano M, Minore Y, Gale M (1994) Conservation of genome structure between rice and wheat. *Bio/Technol* 12: 276-278
- Kush GS (1999) Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* 42: 646-655
- Lagercrantz U (1998) Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that Brassica genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 150: 1217-1228
- Lahaye T, Hartmann S, Töpsch S, Freialdenhoven A, Yano M, Schulze-Lefert P (1998a) High-resolution genetic and physical mapping of the *Rar1* locus in barley. *Theor Appl Genet* 97: 526-534
- Lahaye T, Shirasu K, Schulze-Lefert P (1998b) Chromosome landing at the barley *Rar1* locus. *Mol Gen Genet* 260: 92-101
- Lange T (1998) Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta* 204: 409-419
- Langridge P, Karakousis A, Collins N, Kretschmer J, Manning S (1995) A consensus linkage map of barley. *Mol Breed* 1: 389-395
- Lapitan NLV, Brown SE, Kennard W, Stephens JL, Knudson DL (1997) FISH physical mapping with barley BAC clones. *Plant J* 11: 149-156
- Laurie DA (1997) Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* 35: 167-177
- Laurie DA, Pratchett N, Bezant JH, Snape JW (1995): RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome* 38: 575-585
- Laurie DA, Pratchett N, Romero C, Simpson E, Snape JW (1993) Assignment of the denso dwarfing gene on the long arm of chromosome 3 (3H) of barley by use of RFLP markers. *Plant Breed* 111: 198-203

- Law CN, Snape JW, Worland AJ (1978) The genetic relationships between height and yield in wheat. *Heredity* 40: 133-151
- Law CN, Worland AJ (1985) An effect of temperature on the fertility of wheats containing the dwarfing genes *Rh1*, *Rh2* and *Rh3*. Plant Breeding Institute, Annual Report for 1984, Cambridge, pp 69-71
- Leister D, Kurth J, Laurie DA, Yano M, Sasaki T, Graner A, Schulze-Lefert P (1999) PFLP- and physical mapping of resistance gene homologues in rice (*O.sativa*) and barley (*H.vulgare*). *Theor Appl Genet* 98: 509-520
- Leister D, Kurth J, Laurie DA, Yano M, Sasaki T, Devos K, Graner A, Schulze-Lefert P (1998) Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 370-375
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet* 14: 421-429
- Lenton JR, Hedden P, Gale MD (1987) Gibberellin insensitivity and depletion in wheat—consequences for development. In *Hormone Action in Development—A Critical Appraisal*, eds GV Hoad, JR Lenton, MB Jackson, RK Atkin, London: Butterworths, pp 145–60
- Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938
- Liao YC, Nicks RE (1991) Application of a set of 14 cDNA probes from wheat to detect restriction length polymorphism (RFLP) in barley. *Euphytica* 53: 115-119
- Lim J, Helariutta Y, Specht CD, Jung J, Sims L, Bruce WB, Diehn S, Benfey PN (2000) Molecular analysis of the SCARECROW gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *Plant Cell* 12: 1307-1318
- Linares C, Serna A, Fominaya A (1999) Chromosomal organization of a sequence related to LTR-like elements of Ty1-copia retrotransposons in *Avena* species. *Genome* 42: 706-713
- Liu H, Sachidanandam R, Stein L (2001) Comparative genomics between rice and *Arabidopsis* shows scant collinearity in gene order. *Genome Res* 12: 2020-2026
- Liu Z-W, Biyashev RM, Saghai Maroof MA (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet* 93: 869-876
- Llaca V, Messing J (1998) Amplicons of maize zein genes are conserved within genic but expanded and constricted in intergenic regions. *Plant J* 15: 211-220
- Lovegrove A, Hooley R (2000) Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone. *Trends Plant Sci* 5: 102-110
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible W-R (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123: 795-805

- Manly KF (1993) A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Mammalian Genome* 4: 303-313
- Mather K (1938) *The measurement of linkage heredity*. Methuen & Co, London
- Marek LF, Schoemaker RC (1997) BAC contig development by fingerprint analysis in soybean. *Genome* 40: 420-427
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262: 1432-1436
- Martin GB, Ganai MW, Tanksley SD (1992) Construction of a yeast artificial chromosome library of tomato and identification of cloned segments linked to two disease resistance loci. *Mol Gen Genet* 233: 25-32
- Matsukura C, Itho S, Nemoto K, Tanimoto E, Yamaguchi J (1998) Promotion of leaf sheath by gibberellic acid in a dwarf mutant of rice. *Planta* 205: 145-152
- McAdams HH, Arkin A (1999) It's a noisy business! Genetic regulation at the nanomolar scale. *Trends Genet* 15: 65-69
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000) Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* 123: 439-442
- McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z Xing Y, et al. (2002) Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9: 199-207
- McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, Gale MD, Rogers WJ (1998) Catalogue of gene symbols for wheat. In: *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*. Volume 5. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. 2-7 August (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/98/>)
- McIntosh RA (1979) Catalogue of gene symbols for wheat. In: *Proceedings, Fifth International Wheat Genetics Symposium*, New Dehli, India, February 1978, ed S Ramanjuam. Indian Society of Genetics and Plant Breeding. IARI, New Dehli, India, pp 1299-1309
- Meagher RB, McLean MD, Arnold J (1988) Recombination within a subclass of restriction fragment length polymorphisms may help link classical and molecular genetics. *Genetics* 120: 809-818
- Melchinger AE (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed* 104: 1-19
- Michalek W, Weschke W, Pleissner K-P, Graner A (2002) EST analysis in barley defines a unigene set comprising 4,000 genes. *Theor Appl Genet* 104: 97-103

- Michalek W, Künzel G, Graner A. (1999) Sequence analysis and gene identification in a set of mapped RFLP markers in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 42: 849-853
- Michalek W, Kleine M, Dargatz H, Wenzel G, Jahoor A (1997) Stability of *Hor1*-specific YAC-clones and physical mapping of *Hor1*-loci in barley. *Theor Appl Genet* 95: 369-374
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832
- Miralles DJ, Calderini DF, Pomar KP, D' Ambrogio AD (1998) Dwarfing genes and cell dimensions in different organs of wheat. *J Experimental Bot* 49: 1119-1127
- Mitsunaga S, Tashiro T, Yamaguchi J (1994) Identification and characterization of gibberellin-insensitive mutants of rice. *Theor Appl Genet* 87: 705-712
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD (1995) Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 5:737-739
- Moore G, Abbo S, Cheung W, Foote T, Gale MD, Koebner R, Leitch A, Leitch I, Money T, Stancombe P, Yano M and Flavell R (1993): Key features of cereal genome organization as revealed by the use of cytosine-methylation sensitive restriction endonucleases. *Genomics* 15: 472-482
- Mozo T, Dewar K, Dunn P, Ecker JR, Fischer S, et al. (1999) A complete BAC based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat Genet* 22: 271-275
- Mozo T, Fischer S, Meier-Ewert S, Lehrach H, Altmann T (1998) Use of the IGF library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J* 16: 377-384
- Murray MG, Thomson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325
- Nagamura Y, Inoue T, Antonio BA, Shimano T, Kajiya H, Shomura A, Lin SY, Kubiki Y, Harushima Y, Kurata N, et al. (1995) Conservation of Duplicated Segments between Rice Chromosome 11 and 12. *Breeding Science*, 45: 373-376
- Nakajima K, Benfey PN (2002) Signaling in and out: Control of cell division and differentiation in the shoot and root. *Plant Cell* 14: 265-276
- Near EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257
- Nelson JC, Van Deynze AE, Autrique E, Sorrells ME, Lu YH, Merlino M, Atkinson M, Leroy P (1995) Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 2. *Genome* 38: 516-524
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13839-13844
- Ogas J (1998) Dissecting the gibberellin response pathway. *Curr Biol* 8: 165-167

- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M and Sano H (2000) Rice gibberellin-insensitive gene homologue, *OsGAI*, encodes a nuclear localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* 245:21-29
- Olszewski N, Sun T-p and Gubler F (2002) Gibberellin signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *Plant Cell* 14:61-80
- Orkin SH (1986) Reverse genetics and human disease. *Cell* 47: 845-850
- Pan Q, Liu Y-S, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, Fluhr R (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and Arabidopsis. *Genetics* 155: 309-322
- Panstruga R, Büschges R, Piffanelli P, Schulze-Lefert P (1998): A contiguous 60 kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome. *Nucleic Acids Res* 26: 1056-1062
- Panstruga R, Buschges R, Freialdenhoven A, Ropenack E, Schulze-Lefert P (1997) Insights into non-race-specific resistance: the *mlo*-controlled resistance in barley to powdery mildew. In: An EMBO Workshop 18-20 May, Plant Disease Resistance Gene Function. Moratea, Italy
- Paterson AH (1996) Making genetic maps. In: *Genome Mapping in Plants*, ed AH Paterson, RG Landes, Austin, Texas, USA, pp 23-39
- Paterson AH, Lan TH, Reischmann KP, Chang C, Lin YR, Liu SC, Burow MD, Kowalski SP, Katsar CS, DelMonte TA (1996): Toward a unified genetic map of higher plants, transcending the monocot-dicot divergence. *Nature Genet* 14: 380-382
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F (1999) "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997) The Arabidopsis *GAI* gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin response. *Genes Dev* 11: 3194-3205
- Peng J, Harberd NP (1993) Derivate alleles of the Arabidopsis Gibberellin-insensitive (*gai*) Mutation confer a wild-type phenotype. *Plant Cell* 5: 351-360
- Pereira MG, Lee M (1995) Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theor Appl Genet* 90: 380-388
- Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M (2003) A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 131: 866-871
- Pestova EG, Goncharov NP, Salina EA (1998) Elimination of a tandem repeat of telomeric heterochromatin during the evolution of wheat. *Theor Appl Genet* 97: 1380-1386
- Peters TD (2001) Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* 2: 360-369

- Phinney BO (1956) Growth response of single gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 42: 185-189
- Primrose SB (1996) *Genomanalyse*. Spektrum Akad Verl GmbH Heidelberg Berlin Oxford, pp 128-132
- Prince, J.P., E. Pochard, S.D. Tanksley. (1993) Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome* 36: 404-417
- Puechberty J, Laurent AM, Gimenez S, Billault A, Laurent MEB, Calenda A, Marçais B, Prades C, Loannou P, Yurov Y, et al (1999) Genetic and physical analyses of the centromeric and pericentromeric regions of human chromosome 5: recombination across 5cen. *Genomics* 56: 274-287
- Pysh LD, Wysocka-Diller, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterisation and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J* 18: 111-119
- Qi X, Stam P, Lindhout (1996) Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-394
- Quigley F, Dao P, Cottet A, Mache R (1996) Sequence analysis of an 81 kb contig from Arabidopsis thaliana chromosome III. *Nucleic Acids Res* 24: 4313-4318
- Raventós D, Skriver K, Schlein M, Karnahl K, Rogers SW, Rogers JC, Mundy J (1998) HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *J Biol Chem* 273: 23313-23320
- Reiz LP, Salomon SC (1968) Origin, history and use of Norin 10 wheat. *Crop Sci* 8: 686-689
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harberd P (2001): How Gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 67-88
- Richards DE, Peng J, Harberd NP (2000) Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *BioEssays* 22: 573-77
- Richter TE, Roland PC (2000) The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol* 42: 195-204
- Robertson M, Swain SM, Chandler PM, Olszewski NE (1998) Identification of a negative regulator of gibberellin action, HvSPY, in barley. *Plant Cell* 10: 995-1007
- Rogers SW, Rogers JC (1999) Cloning and characterization of a gibberellin-induced RNase expressed in barley aleurone cells. *Plant Physiol* 119: 1457-1464
- Rogers JC, Lanahan MB, Rogers SW (1994) The *cis*-acting gibberellin response complex in a high-pl α -amylase promoters. *Plant Physiol* 105: 151-158
- Ross JJ, Murfet IC, Reid JB (1997) Gibberellin mutants. *Plant Physiol* 100: 550-60

- Rossberg M, Theres K, Acarkan A, Herrero R, Schmitt T, Schumacher K, Schmitz G, Schmidt R (2001) Comparative sequence analysis reveals extensive microcolinearity in the *LATERAL SUPPRESSOR* regions of the Tomato, Arabidopsis, and Capsella genomes. *Plant Cell* 13: 979-988
- Russel J, Fuller J, Young G, Thomas B, Taramino G, Macaulay M, Waugh R, Powell W (1997) Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40: 442-450
- Saghai Maroof MA, Yang GP, Biyashev RM, Maughan PJ, Zhang Q (1996) Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP linkage mapping. *Theor Appl Genet* 92: 541-551
- Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470
- Saji S, Umehara Y, Antonio BA, Yamane H, Tanoue H, Baba T, Aoki H, Ishig N, Wu J, Koike K, Matsumoto T, Sasaki T (2001) A physical map with yeast artificial chromosome (YAC) clones covering 63% of the 12 rice chromosomes. *Genome* 44: 32-37
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sakata K, Nagamura Y, Numa H, Antonio BA, Nagasaki H, Idonuma A, Watanabe W, Shimizu Y, Horiuchi I, Matsumoto T, Sasaki T and Higo K (2002) RiceGAAS: an automated annotation system and database for rice genome sequence. *Nucleic Acid Res* 30:98-102
- Sakata K, Antonio BA, Mukai Y, Nagasaki H, Sakai Y, Makino K, Sasaki T (2000) INE: A Rice Genome Database with an integrated map view. *Nucleic Acids Res* 28: 97-102
- Salamini F, Özkan H, Brandolini A, Schäfer-Pregl R, Martin W (2002) Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Genetics* 3: 429-435
- Salentijn EMJ, Arens-De Reuver MJB, Lange W, De Bock TSM, Stiekema WJ, Klein-Langhorst RM (1995) Isolation and characterization of RAPD-based markers linked to the beet cyst nematode resistance locus (*HsIpat-1*) on chromosome 1 of *B. patellaris*. *Theor Appl Genet* 90: 885-891
- Salse J, Piegu B, Cooke R, Delseny M (2002) Synteny between Arabidopsis thaliana and rice at the genome level: a tool to identify conservation in the ongoing rice genome sequencing project. *Nucleic Acids Res* 30: 2316-2328
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1998) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sánchez-Fernández R, Ardiles-Díaz W, Van Montagu M, Inze D, May MJ (1998) Cloning of a novel Arabidopsis thaliana RGA-like gene, a putative member of the VHIID-domain transcription factor family. *J Exp Bot* 49: 1609-1610

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sandhu D, Gill KS (2002): Gene-Containing Regions of Wheat and the Other Grass Genomes. *Plant Physiol* 128: 803-811
- Sandhu D, Champoux JA, Bondareva SN, Gill KS (2001) Identification and physical localization of useful genes and markers to a major gene-rich region on wheat group 1S chromosomes. *Genetics* 157: 1735-1747
- SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* 20: 43-45
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, et al (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768
- Sanz-Alferez S, Richter TE, Hulbert SH, Bennetzen JL (1995) The Rp3 disease resistance gene of maize: mapping and characterization of introgressed alleles. *Theor Appl Genet* 91: 25-32
- Sasaki T, Burr B (2000) International Rice Genome Sequencing Project: The Effort To Completely Sequence the Rice Genome. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 138-141
- Schaefer C, Golds T, Gierl A (2000) Development of an En/Spm transposon system for barley, *Maize Genetics Conference Abstracts* 42: P157
- Scheres B, Di Laurenzio L, Willemsen V, Hauser M-T, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN (1995) Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the radial axis. *Development* 121: 53-62
- Schmidt R (1998) Physical mapping of the Arabidopsis thaliana genome. *Plant Physiol Biochem* 36: 1-8
- Scholz S, Lorz H, Lutticke S (2001) Transposition of the maize transposable element Ac in barley (*Hordeum vulgare* L.). *MGG* 264: 653-661
- Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K (1999) The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 290-295
- Sears ER (1954) The aneuploids of common wheat. *Research Bulletin* 572. University of Missouri Agricultural Experiment Station, Columbia, pp 1-58
- Shirasu K, Lahaye T, Tan M, Zhou F, Azevedo C, Schulze-Lefert P (1999) A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99: 355-366
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8794-8797

- Silverstone AL, Jung H-S, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T-p (2001) Repressing a repressor: Gibberellin rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1555-1566
- Silverstone AL, Sun T-P (2000) Gibberellins and the Green Revolution. *Trends Plant Sci* 5: 1-2
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T-p. (1998) The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10: 155-69
- Silverstone AL, Mak PYA, Martinez EC, Sun T-p (1997) The new *RGA* locus encodes an negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146: 1087-1099
- Simons G, Van der Lee T, Diergaarde P, Van Daelen R, Groenendijk J, Fritjers A, Buschges R, Hollrichter K, Topsch S, Schulze-Lefert P, et al. (1997) AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44: 61-70
- Smilde WD, Haluskova J, Sasaki T, Graner A (2001) New evidence for the synteny of rice chromosome 1 and barley chromosome 3H from rice expressed sequence tags. *Genome* 44: 361-367
- Smith RF, Smith TF (1992) Pattern-induced multi-sequence alignment (PIMA) algorithm employing secondary structure-dependent gap penalties for comparative protein modelling. *Protein Engineering* 5: 35-41
- Smith RF, Smith TF (1990) Automated generation of primary sequence patterns from sets of related protein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 118-122
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7719-7723
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Steber CM, Cooney S, McCourt P (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149: 509-521
- Stein N, Feuillet C, Wicker T, Schlagenhauf E, Keller B (2000) Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13436-14441
- Sun T-p (2000) Gibberellin signal transduction. *Current Opin Plant Biol* 3: 374-380
- Swain SM, Olszewski NE (1996) Genetic analysis of gibberellin signal transduction. *Plant Physiol* 112: 11-17
- Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, Dudler R (2000) Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J* 24: 895-903

- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Rev Genet* 3: 1-7
- Tanksley SD, Ganai MW, Martin GB (1995) Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* 11: 63-68
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, De Vicente MC, Bornierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, et al. (1992) High density molecular linkage maps of tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160
- Tanksley SD, Bernatzky R, Lapitan NL, Prince JP (1988) Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6419-6423
- Tao Q, Chang Y-L, Wang J, Chen H, Islam-Faridi MN, Scheuring C, Wang B, Stelly DM, Zhang H-B (2001) Bacterial artificial chromosome-based physical map of the rice genome constructed by restriction fingerprint analysis. *Genetics* 158: 1711-1724
- Tao Q, Zhao H, Qiu L, Hong G (1994) Construction of a full bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Oryza sativa* genome. *Cell Res* 4: 127-133
- Tarchini R, Biddle P, Wineland R, Tingey S, Rafalski A (2000) The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1 - Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. *Plant Cell* 12: 381-392
- Tomkins JP, Mahalingham R, Miller-Smith H, Goicoechea JL, Knapp HT, Wing RA (1999a) A soybean bacterial artificial chromosome library for PI 437654 and the identification of clones associated with cyst nematode resistance. *Plant Mol Biol* 41: 25-32
- Tomkins JP, Yu Y, Miller-Smith H, Frisch DA, Woo S, Wing RA (1999b) A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theor Appl Genet* 99: 419-424
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Thomas WTB, Swanston JW (1991) The effects of major genes on quantitatively varying characters in barley. The *GP-ert* and *denso* loci and quality characters. *Heredity* 66: 381-389
- Thomasson JR (1987) Fossil grasses, 1820-1986 and beyond. In: *Grass Systematics and Evolution*, eds TR Soderstrom, KW Hilu, CS Campbell, ME Barkworth, Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 159-167
- Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE. 1999. Gibberellin signal transduction presents... the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci* 4: 424-28
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J* 11: 1369-1376
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Itho H, Kobayashi M, Kitona H, Matsuoka M (2001) Characterization of rice dwarf mutant, *GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF 1 (GIDI)*. In

17th International Conference on Plant Growth Substances; July 1-6, 2001, Brno, Czech Republic

Ueguchi-Tanaka M, Fujisawa Y, Kobayashi M, Ashikari M, Iwasaki Y, Kitano H, Matsuoka M (2000) Rice dwarf mutant *dl*, which is defective in the α subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11638-11643

Umehara Y, Inagaki A, Tanoue H, Yasukochi Y, Nagamura Y, Saji S, Otsuki Y, Fujimura T, Kurata N, Minobe Y (1995) Construction and characterization of a rice YAC library for physical mapping. *Mol Breed* 1: 79-89

Van der Knaap E, Kim JH, Kende H (2000) A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol* 122: 695-704

Van Deynze AE, Sorrells ME, Park WD, Ayres NM, Fu H, Cartinhour SW, Paul E, McCouch SR (1998) Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theor Appl Genet* 97: 356-369

Van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, McCouch SR, Sorrells ME (1995) Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol Gen Genet* 248: 744-754

Van Ooijen JW, Voorrips RE (2001) Join Map 3.0 Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands

Van Schaik NW, Brink RA (1959) Transpositions of modulator, a component of the variegated pericarp allele in maize. *Genetics* 44: 725-738

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414

Wang GL, Holsten TE, Song WY, Wang HP, Ronald PC (1995) Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus. *Plant J* 7: 525-533

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959-13964

Waterhouse PM, Wang MB, Finnegan EJ (2001) Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci* 6: 297-301

Waugh R, Bonar N, Baird E, Thomas B, Graner A, Hayes P, Powell W (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol Gen Genet* 255: 311-321

Webb SE, Appleford NEJ, Gaskin P, Lenton JR (1998) Gibberellins in internodes and ears of wheat containing different dwarfing alleles. *Phytochemistry* 47: 671-77

Wei F, Gobelmann-Werner K, Morroll SM, Kurth J, Mao L, Wing RA, Leister D, Schulze-Lefert P, Wise RP (1999) The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with

three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* 153: 1929-1948

Wen C-K, Chang C (2002) *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14: 87-100

Wessler SR (1997) Transposable elements and the evolution of gene expression. *SEB* 1039: 115-132

Wilson RN, Somerville CR. 1995. Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (*gai*) of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108: 495–502

Wolfe KH, Gouy M, Yang Y-W, Sharp PM, Li W-H (1989) Date of monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6201-6205

Woo S-S, Jiang J, Gill BS, Peterson AH, Wing RA (1994) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* 22: 4922-4931

Worland T, Snape JW (2001) Gibberellic acid insensitive dwarfing genes. In *The World Wheat Book-a history of wheat breeding*, eds AP Bonjean, WJ Angus, Lavosier, London, Paris, New York, pp 68-70

Worland J, Law CN, Petrovic S (1990) Height reducing genes and their importance to Yugoslavian winter wheat varieties. *Savremena Poljo-privreda* 38: 245-258

Worland AJ, Petrovic S (1988) The gibberellic acid insensitive dwarfing genes from the variety Saitama 27. *Euphytica* 38: 55-63

Worland AJ (1986) The gibberellic acid insensitive dwarfing genes in Southern Europe wheats. *Euphytica* 35: 857-866

Worland AJ, Sayers EJ (1995) *Rht1* (*B.dw*), an alternative allelic variant for breeding semi-dwarf varieties. *Plant Breed* 114:397-400

Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada Ch, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, et al. (2002) A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *The Plant Cell* 14: 525-535

Xu Y-L, Gage DA, Zeevaart JAD (1997) Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 1471-1476

Xu Y-L, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA, Zeevaart JAD (1995) The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase. *Molecular cloning and functional expression*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6640-6644

Yamaguchi S, Kamiya Y (2000) Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* 41: 251-257

- Yamamoto T, Kuboki Y, Lin SY, Sasaki T, Yano M (1998) Fine mapping of quantitative trait loci Hd-1, Hd-2 and Hd-3, controlling heading date of rice, as single mendelian factors. *Theor Appl Genet* 97: 37-44
- Yamamoto K, Sasaki T (1997) Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol Biol* 35: 135-144
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Z-X, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T (1998) Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1663-1668
- Young ND (1990) Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiol Mol Plant Pathol* 37: 81-94
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296 :79-92
- Yu Y, Tomkins JP, Waugh R, Frisch DA, Kudrna D, Kleinhofs A, Brueggeman RS, Muehlbauer GJ, Wing RA (2000) A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare*). *Theor Appl Genet* 101: 1093-1099
- Yu YG, Buss GR, Maroof MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11751-11756
- Yuan Q, Quackenbush J, Sultana R, Perteua M, Salzberg SL, Buell CR (2001) Rice bioinformatics. Analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. *Plant Physiol* 125: 1166-1174
- Yuan Q, Liang F, Zismann V, Hsiao J, Benito MI, Quackenbush J, Wing R, Buell CR (2000) Anchoring of rice BAC clones to the rice genetic map *in silico*. *Nucleic Acids Res* 28: 3636-3641.
- Zhang H, Jia J, Gale MD, Devos KM (1998) Relationships between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. *Appl Genet* 96: 69-75
- Zhang H-B, Wing RA (1997) Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Mol Biol* 35: 115-127
- Zhang H-B, Choi S, Woo SS, Li Z, Wing RA (1996) Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome library from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Mol Breed* 2: 11-24
- Zhang J, Friebe B, Gill BS (1995) Detection of maize DNA sequences amplified in wheat. *Genome* 38: 946-950
- Zwar JA, Chandler PM (1995) Alpha-amylase production and leaf protein synthesis in a gibberellin-responsive dwarf mutant of Himalaya barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 197: 39-48

8 ANHANG**Puffer für die Isolierung genomischer Pflanzen-DNA und die Gelelektrophorese**

CTAB-Puffer: 2 % Cetyltrimethylammoniumbromid; 0,1 M Tris / HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0); 1 % (w / v) PVP (MW 40.000); 1,4 M NaCl; 0,28 M β -Mercaptoethanol

TE-Puffer: 10 mM Tris / HCl (pH 8,0) ; 1mM EDTA (pH 8,0)

10x TBE-Puffer : 0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA (pH 8,0)

10x Auftragepuffer: 40 % (w / v) Glycerin; 0,2 M EDTA; Bromphenolblau; Xylencyanol

Lösungen, Medien und Puffer für Arbeiten mit Bakterien und Plasmiden

LB-Medium (flüssig): 1 % Bacto-Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt

LB-Medium (fest): 15 % (w / v) Bacto-Agar; 1 % Bacto-Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt

Indikatorplatten: LB-Medium (fest): 60 μ g / ml X-Gal; 60 μ g / ml IPTG; 0,1 mg / ml Ampicillin

ASMP I Lösung (100 ml): 0,9 g Glucose; 2,5 ml 1M Tris / HCL (pH 8.0); 2,0 ml 0,5 M EDTA; 95 ml H₂O_{dd} (Lösung abschließend autoklavieren)

ASMP II Lösung (100 ml): 29,5 g Kaliumacetat; 11.5 ml Essigsäure (Lösung zunächst in 50 ml H₂O_{dd} lösen und dann auf 100 ml auffüllen, abschließend autoklavieren)

Lysepuffer: 0,2 M NaOH; 1 % (w / v) SDS

Lösungen und Puffer für Southern-Blotting, radiaktive Markierung und Hybridisierung

Alkalischer Transferpuffer: 0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl

20 x SSC Puffer (pH 7,0): 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat

20 x SSPE-Puffer (pH 7,4): 2,98 M NaCl ; 0,2 M NaH₂PO₄ ; 0,02 M EDTA

100x Denhardt: 2 % (w / v) PVP (MW 40.000); 2 % (w / v) BSA; 2 % (w / v) Ficoll (MW 400.000)

Hybridisierungslösung: 5 x SSPE; 5x Denhardt; 2 % (w / v) SDS; 250 µg / ml Heringssperma

Sephadex: 4 g Sephadex G-50 in 1 l TE (pH 8,0)

Waschlösung I: 0,5 x SSC; 0,1 % (w / v) SDS

Reis-Waschlösung I: 2,0 x SSC; 0,1 % (w / v) SDS

Waschlösung II: 0,2 x SSC; 0,1 % (w / v) SDS

Reis-Waschlösung II: 1,0 x SSC; 0,1 % (w / v) SDS

Stripplösung (A): 0,2 M NaOH; 0,1 % (w / v) SDS; 30 mM Tris (pH 7,5)

Stripplösung (B): 0,1 % (w / v) SDS in kochendem H₂O

Tabelle A1: Chemikalien

Substanz	Hersteller
Albumin Fraktion (BSA)	Serva, Heidelberg
Agarose (Standard)	Gibco BRL, Gaithersburg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma, St. Louis
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe
2'-DesoxyNucleotide (dNTPs)	Promega, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma, St. Louis
D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heringssperma	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KAc	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ * 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
MgSO ₄ * 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ * 4H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat	Gibco BRL, Gaithersburg
[α - ³²]dCTP	Amersham, Braunschweig
Phenol	Fluka, Neu-Ulm
Polyvinylpyrrolidon (PVP)-10	Sigma, St. Louis
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS ultrapure (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Sephadex G-50	Pharmacia, Uppsala
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)	Gibco BRL, Gaithersburg
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Yeast Extract	Difco, Detroit

Tabelle A2: Eingesetzte Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Hersteller
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Dra</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>EcoR</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Eco</i> RV	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Hha</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Pst</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Sty</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Taq</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
<i>Xba</i> I	New England Biolabs, Roche, Basel, Schweiz
weitere Enzyme	Hersteller
Klenow-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim, Deutschland
RNase A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Quiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle A3: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix	Perkin-Elmer, USA
Random-Prime-Kit	Amersham, Braunschweig, Deutschland

Tabelle A4: Liste der eingesetzten Primer für die STS- und SNP-Analysen

Primerbezeichnung	Gersten-ESTs ¹⁾	Basen	Nucleotidsequenz (5' - 3')	T_m (°C)
BEST1a-f	GBR0586v	18	GGCGAGACGAACCCCTCC	62,8
BEST1a-r		20	GGTTCATCCCGGTGATGGAG	61,4
BEST1aa-f	GBR0586v	16	CACCGGGCATCCCTGA	56,9
BEST1aa-r		20	TGAAGTGAAGCCGGTCAAC	61,4

Tabelle A4: Fortsetzung

Primerbezeichnung	Gersten-ESTs ¹⁾	Basen	Nucleotidsequenz (5' - 3')	Tm (°C)
BEST1b-f	GBR0586u	19	TTCGAGGACTGGACTGGCG	61,0
BEST1b-r		19	CCTGGGCCACATGAAAACG	58,8
BEST2-f	GBR0840v	19	TCTCCTCTACCGCCTCCG	63,1
BEST2-r		18	AATGCCCCGCCTGGACAAG	58,2
BEST3-f	GBR0336contig	19	CCCGTTCCGTCTCCCGTAG	63,1
BEST3-r		20	ATCCATGACTGGGGTGGCAG	61,4
BEST4-f	GBR0335contig	19	TCTTCCCCCAACCACACC	61,0
BEST4-r		20	TTTCATTGACCGCAACAAGG	55,3
BEST5-f	GBR0334contig	20	TGTACCCCCATTTTGGGCAG	59,4
BEST5-r		20	TCAATGCGCCCATCATTGTC	57,3
MWG2287-f	-	19	CACAGCATGGCTGAGGAGT	58,8
MWG2287-r	-	19	TGGAATCGTGAGCTTGAGG	56,7

¹⁾ 'u': 3' EST-Sequenz; 'v': 5' EST-Sequenz; 'contig': Consensus-Sequenz

Tabelle A5: Allelspezifische Primer für die Reissequenz von SORF II

Primerbezeichnung	Basen	Nucleotidsequenz (5' - 3')	Tm (°C)
CCgP1-f	20	CACATCGTCGACCTCAGCAC	61,4
CCgP1-r	22	AGATTTGAGGAGCATGGTACGG	60,3
CCgP2-f	19	AGATCCTGTGGGTGCTCAAC	58,8
CCgP2-r	20	GTGCTGAGGTCGACGATGT	59,4
CCgP3-f	20	GACGAGGGGAGGAGGAGGAG	65,5
CCgP3-r	20	CGTGCTGAGGTCGACGATGT	61,4
CCgP4-f	20	GTTGGGGAACCTCAACAGCA	59,4
CCgP4-r	20	GTGCTGAGGTCGACGATGTG	61,4
CCgP5-f	18	CCCGTCGTGCACATCGTC	60,5
CCgP5-r	18	TCGTCGTCTCCCGCTTC	60,5

Tabelle A6: Übersicht über die eingesetzten RFLP- und EST-Sonden

Sonde	Gerste 2H	Reis 7	Enzym	Quelle
BCD855	2HS	7L	<i>EcoRV</i>	EGRAM-Ankermarker, Set 1
BG608073	2HS	-	<i>HindIII</i>	Reis-BAC (db-EST-Screening)
BG314153	2HS	-	<i>DraI</i>	Reis-BAC (db-EST-Screening)
BE403266	-	-	-	db-EST-Screening
BE603344	-	-	-	db-EST-Screening
BE446167	-	-	-	db-EST-Screening
BE405601	-	-	-	db-EST-Screening
BE602062	-	-	-	db-EST-Screening
CA501242	-	-	-	Reis-BAC (db-EST-Screening)
C1467	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C1008	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C1521	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C1485	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C437	2HL	7L	<i>HindIII</i>	RGP-Reiskarte
C63010	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C50171	2HS	7L	<i>BamHI</i>	RGP-Reiskarte
C51334	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C847	-	7L	-	RGP-Reiskarte
C1412	2HS	7L	-	RGP-Reiskarte
C30454	2HS	-	<i>XbaI</i>	Reis-YAC (RGP-Daten)
C30314	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
C11737	-	-	-	Reis-BAC (RGP-Daten)
C53939	-	-	-	Reis-BAC (RGP-Daten)
C827	-	-	-	Reis-BAC (RGP-Daten)
CDO385	-	7L	-	EGRAM-Ankermarker, Set 1
CDO405	-	7L	-	EGRAM-Ankermarker, Set 1
CSU109	-	7S	-	EGRAM-Ankermarker, Set 1
cMWG658	-	-	<i>Bam HI</i>	'Igri x Franka'- Karte
E1186	-	7L	-	RGP-Reiskarte
E61009	-	7L	-	RGP-Reiskarte
E60152	-	7L	-	RGP-Reiskarte
E11335	-	7L	-	RGP-Reiskarte
E3366	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
E4077	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
E232	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
E31979	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
E61111	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)

Tabelle A6: Fortsetzung

Sonde	Gerste 2H	Reis 7	Enzym	Quelle
E3930	-	-	-	Reis-BAC (RGP-Daten)
GBR0327	-	-	-	B-EST-Screening
GBR0333	-	-	-	B-EST-Screening
GBR0334	2HL	-	-	B-EST-Screening
GBR0335	2HL	-	-	B-EST-Screening
GBR0336	2HL	-	-	B-EST-Screening
GBR0337	2HS	7L	<i>EcoRV</i>	B-EST-Screening
GBR0432	2HS	-	-	B-EST-Screening
GBR0509	-	-	-	Reis-BAC (B-EST-Screening)
GBR0586	2HS	7L	<i>DraI</i>	B-EST-Screening
GBR0840	-	-	-	B-EST-Screening
HZ53002	2HS	-	<i>XbaI</i>	Reis-BAC (B-EST-Screening)
IAG68	2HL	-	<i>DraI</i>	'Igri x Franka'- Karte
L585	-	7L	-	RGP-Reiskarte
MWG557	2HS	-	-	'Igri x Franka'- Karte
MWG2054	2HS	-	<i>EcoRV / HindIII</i>	'Igri x Franka'- Karte
MWG2058	2HS	-	<i>EcoRV</i>	'Igri x Franka'- Karte
MWG2287	2HS	-	<i>HindIII / BamHI</i>	'Igri x Franka'- Karte
PSR8	-	7L	-	EGRAM-Ankermarker, Set 1
PSR146	-	7L	-	EGRAM-Ankermarker, Set 1
R1245	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R1357	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R1422	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R1477 A	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R1988	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R2561	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R2677	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R2394	-	7L	-	RGP-Reiskarte
R2401	-	7S	-	EGRAM-Ankermarker, Set 2
R10429	2HS	-	<i>DraI / EcoRI</i>	Reis-YAC (RGP-Daten)
R10028	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
R3349	-	-	-	RGP-Reiskarte
S980	2HS oder L	7L	<i>DraI</i>	RGP-Reiskarte
S1563	-	7L	-	RGP-Reiskarte
S1848	2HS	7L	<i>HindIII</i>	RGP-Reiskarte
S2055	-	7L	-	RGP-Reiskarte
S2089	-	7L	-	RGP-Reiskarte
S2279	2HS	7L	<i>DraI</i>	RGP-Reiskarte
S10051	-	7L	-	RGP-Reiskarte

Tabelle A6: Fortsetzung

Sonde	Gerste 2H	Reis 7	Enzym	Quelle
S13453	-	7L	<i>HindIII</i>	RGP-Reiskarte
S13931	-	7L	-	RGP-Reiskarte
S5033	-	-	-	Reis-YAC (RGP-Daten)
S20451	2HS	-	<i>EcoRV</i>	Reis-YAC (RGP-Daten)
S6467	-	-	-	Reis-BAC (RGP-Daten)
SbRPG663	-	7S	-	EGRAM-Ankermarker, Set 2

Tabelle A7: Elektronisch zugeordnete ESTs aus der Reis-BAC-Zielregion

Reis-BAC	annotierte ESTs	Pflanze	EMBL Accession	BLASTN (e-Wert)	Position (kb)	Bemerkung
OJ1047_C01 (AP003985)	BG608073	Weizen	BG608073	5e ⁻⁸⁸	3.7	kartiert
	BG314153	Weizen	BG314153	5e ⁻⁷¹	3.7	kartiert
	GBR1780	Gerste	BU985030	1e ⁻¹³²	23.0	
	HW05A03	Gerste	AL501679	4e ⁻⁷¹	23.0	
	S5104	Reis	AU102012	0.0	29.0	
	S20451	Reis	AU56293	0.0	40.2	kartiert
	GBR1055	Gerste	AL509032	0.0	40.2	
	C63978	Reis	AU172416	1e ⁻¹⁶¹	60.9	
	R10028	Reis	AU070661	1e ⁻¹⁷⁷	65.8	
	R10426	Reis	AU162593	0.0	80.2	
	HK04G04	Gerste	AL499990	1e ⁻⁴¹	80.2	
-	Reis	AU173826	9e ⁻⁸⁹	97.4		
OSJNBb0005G07 (AP005149)	HW09N03	Gerste	AL505887	2e ⁻³⁶	27.0	
	GBR0509	Gerste	AL511132	2e ⁻⁴⁴	29.8	monomorph
	R4095	Reis	AU075838	3e ⁻⁵¹	34,2	
	S20251	Reis	AU056052	6e ⁻³⁴	45.2	
	E11335	Reis	AU075687	9e ⁻⁹⁵	51.2	
	CA501242	Weizen	CA501242	6e ⁻⁹²	56.0	
	S6467	Reis	AU161952	5e ⁻⁹³	65.9	
	R2677	Reis	AU031929	1e ⁻¹²³	65.9	monomorph
	C11737	Reis	C26150	1e ⁻¹⁵⁵	68.2	
S1352	Reis	D39765	1e ⁻¹⁵⁹	76.6		

Tabelle A7: Fortsetzung

Reis-BAC	annotierte ESTs	Pflanze	EMBL Accession	BLASTN (e-Wert)	Position (kb)	Bemerkung
OJ1174_G05 (AP003750)	C827	Reis	AU075621	1e ⁻¹⁰¹	60.2	
	-	Reis	AU173774	8e ⁻⁹⁶	44.4	
	E30890	Reis	C74329	1e ⁻¹²¹	35.0	
	E30314	Reis	AU029404	1e ⁻¹⁷²	6.5	
OJ1710_H11 (AP003846)	HZ53O02	Gerste	CA026026	1e ⁻⁶³	6.3	kartiert
	BQ609302	Weizen	BQ609302	3e ⁻⁵¹	6.3	
	HB03M21	Gerste	BU967276	8e ⁻⁴⁰	11.1	
	HM05C14	Gerste	BU993959	2e ⁻⁸⁵	19.4	
	GBR1785	Gerste	-	1e ⁻⁹⁸	29.5	
	C303454	Reis	AU068564	1e ⁻¹³⁰	29.5	kartiert
	GBR1788	Gerste	BU995870	0,0	30.7	

Tabelle A8: Ergebnis der RFLP-Analyse mit 40 F₃ Pflanzen

Pflanze	MWG2054	MWG557	MWG2058	MWG2287	<i>gai</i>	cMWG658	XIAG68
1	-	-	B	B	B	B	B
2	H	H	H	H	H	H	H
3	H	B	B	B	B	B	B
4	B	B	B	B	B	B	B
5	H	H	B	B	B	B	B
6	B	H	H	H	H	H	A
7	H	A	A	A	A	A	A
8	H	A	H	H	H	H	H
9	H	H	H	H	H	H	H
10	B	B	B	B	B	B	B
11	H	H	H	H	H	H	H
12	H	H	H	H	H	H	H
13	H	H	H	H	H	H	H
14	H	H	H	H	H	H	H
15	H	H	H	H	H	H	H
16	H	H	H	H	H	H	H
17	H	H	H	H	B	H	B
18	H	H	H	H	H	H	H
19	H	H	H	H	H	H	H
20	B	B	B	B	B	B	B
21	B	B	B	B	B	B	B
22	B	B	B	B	B	B	B
23	H	H	H	H	H	H	H
24	-	A	A	A	A	A	A

Tabelle A8: Fortsetzung

Pflanze	MWG2054	MWG557	MWG2058	MWG2287	<i>gai</i>	cMWG658	XIAG68
25	-	H	H	H	H	H	H
26	-	H	H	H	H	H	H
27	A	A	A	A	A	A	A
28	B	B	B	B	B	B	B
29	B	B	B	B	B	B	B
30	H	H	H	H	H	H	H
31	B	B	B	B	B	B	B
32	H	B	B	B	B	B	B
33	B	B	B	B	B	B	B
34	A	A	A	A	A	A	H
35	H	H	H	H	B	H	H
36	H	H	H	H	H	H	H
37	H	H	H	H	H	H	H
38	H	A	A	A	A	A	A
39	H	H	H	H	H	H	H
40	H	H	H	H	H	H	H

Für den Aufbau der hochauflösenden Population ausgewählte Pflanzen werden durch Fettdruck hervorgehoben

Tabelle A9: Rekombinante F₂' Genotypen für den Aufbau der hochauflösenden Karte

Pflanze	Genotyp		Pflanze	Genotyp	
	MWG658	MWG2287		MWG658	MWG2287
12	B	H	538	H	A
21	H	B	553	A	H
28	H	A	559	A	H
32	H	A	576	B	H
37	B	H	580	H	A
59	B	H	587	B	H
65	A	H	590	B	H
76	A	H	597	H	A
84	H	B	600	B	H
93	H	B	623	B	H
117	A	H	625	B	H
118	A	H	632	H	A
136	A	H	633	A	H
142	B	H	685	H	B
147	A	H	692	B	H
150	H	B	725	H	B
191	H	B	742	H	A
196	H	A	756	B	H
200	B	A	761	H	B
209	B	H	767	H	A
223	B	H	773	B	H

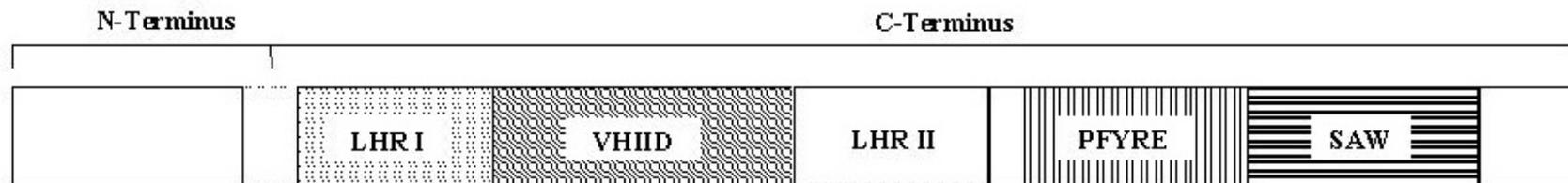
Tabelle A9: Fortsetzung

Pflanze	Genotyp		Pflanze	Genotyp	
	MWG658	MWG2287		MWG658	MWG2287
227	H	A	816	B	H
241	H	B	819	H	A
256	A	H	821	B	H
261	H	A	829	B	H
269	A	H	839	B	H
286	B	H	844	B	H
312	B	H	862	H	A
314	H	A	864	B	H
321	H	A	865	B	H
323	H	B	866	A	H
349	A	H	881	B	H
358	A	H	889	B	H
371	H	B	894	H	A
413	B	H	900	H	B
418	B	H	925	H	A
423	H	A	927	B	H
431	H	A	949	B	H
455	A	H	951	B	H
505	B	H	958	B	H
511	A	H			
517	H	B			
521	A	H			
528	H	A			
537	H	A			

Tabelle A10: In ausgewählten Gersten-ESTs und der Gersten-STS-Sonde MWG2287 identifizierte SNPs

Sonde	EMBL-Acc.	PCR-Fragment	SNP	Position ¹⁾
sGBR0586 (5' Sequenz) ²⁾	AL504016	501 bp	A → C	93 bp
			C → G	102 bp
sMWG2287 ²⁾	AJ234879	277 bp	G → T	23 bp
GBR0586 (3' Sequenz)	AL500724	404 bp	T → C	52 bp
GBR0336 (3' Sequenz) (5' Sequenz)	AL509286	700 bp	T → C	700 bp
	AL505993			
GBR0335 (3' Sequenz) (5' Sequenz)	AL509290	501 bp	A → G	402 bp
	AL505994		G → C	475 bp
			T → G	476 bp

¹⁾ Die Positionen basieren auf den Allel spezifischen Sequenzen der Kartierungseltern 'Hv287' und 'Monte Christo' ²⁾ SNP-Screeningmarker, das 's' vor der Sondenbezeichnung steht für SNP-Marker



Leucine Heptad (LHR) I

OsGAI	238	GIR--LVHALLACAEAVQQENFAAAEALVKQIPTLAAS	QGGAMRKVAAYFGEAL-----ARRV-YRFRP
Rht-D1	213	GIR--LVHALLACAEAVQQENLSAAEALVKQIPLLAAS	QGGAMRKVAAYFGEAL-----ARRV-FRFRP
GAI	147	GVR--LVHALLACAEAVQKENLTVAEALVKQIGFLAVS	QIGAMRKVATYFAEAL-----ARRI-YRLSP
SCR	267	GLH--LLTLLLQCAEAVSADNLEEANKLLEISQLSTP	YGTSAQRVAAYFSEAMS-----ARLL-NSCLG
Ls	37	AIQ--IRQLLISCAELISQSDFSAAKRLLTILSTNSSP	FGD
GARF I	175	GGGRMATQLLLECARSVAAARDSQRVQQLMMLNELASP	YGDVEOKLASYFLQGL----FARLTASGPRTLRT
SHR	75	ANAKWADSVLLEAARAFSDKDTARAQQILWTLNELSSP	YGDTEOKLASYFLQAL----FNRMTGSGERCYRT
GARF II	62	G---CMEQLLVHCANAIEANDATLTQQILWVLNNIAPA	DGDSNQRLTAAFLLCAL----VSRASRTG--ACKA

Abbildung A1: Proteinsequenzvergleich in vier konservierten und spezifische GRAS-Sequenzregionen

Die für alle GARS-Proteine konservierte C-terminale Region kann in fünf nachweisbare Motive eingeteilt werden (schematische Darstellung nach Pysh et al. 1999). Alignment der LHR I und II, PFYRE und SAW Sequenzmotive zwischen SORF I, II und sechs funktionell charakterisierten GRAS-Proteinen. Die Nummern vor den Sequenzen verweisen auf die jeweils erste AS des Alignments. Die P-F-Y-R-E und S-A-W Motive sind durch Sterne gekennzeichnet (Pysh et al. 1999).

PFYRE (Forstsetzung)

```

OsGAI    HYYSTMFDLSLEGGSSGQA--ELSPFAAG--GGGGTDQVMSEVYLGRQICNVV
Rht-D1   HYYSTMFDLSLEGGSSGGPSEVSSGAAAAPAAAGTDQVMSEVYLGRQICNVV
GAI      HYYSTLFDLSLEG-----V-----PSGQDKVMSEVYLGKQICNVV
SCR      HYYSALEFDLSLGA-----SYGEE-----SEERHVVEQQLLSKEIRNVL
Ls       DYYTAVFDLSLEA-----TLP-----PGSRERMTVEQVWFGREIVDIV
GARF I   RFFSAYMDSLE-----ESFP-----KTSNERLALERGAGRAIVDLV
SHR      RWFRCVCFESWE-----ESFP-----RTSNERLMLERAAGRAIVDLV
GARF II  NFLWIPYDAVD-----TFLP-----KGSEQRRWYEAEVGWKVENVL
          *                   *   *

```

SAW

```

OsGAI    493 ACEGAER TERHETLGQWRNRLGRAGFEPVHLGSMAYKQASTLLALFAGGDG-YRVEEKEG-----CLTLGWHTRPLIATSAW
Rht-D1   487 ACEGAER TERHETLGQWRNRLGNAGFETVHLGSMAYKQASTLLALFAGGDG-YKVEEKEG-----CLTLGWHTRPLIATSAW
GAI      414 ACDGPDR VERHETLSQWRNRFSGAGFAAAHIGSMAPKQASMLLALFNGGEG-YRVEESDG-----CLMLGWHTRPLIATSAW
SCR      534 AVGGPSR SGEVK-FESWREKMQQCQGFKGISLAGNAATQATLLLGMF-PSDG-YTLVDDNG-----TLKLGWKDLSLLTASAW
Ls       311 AMEGDKR KERHERFRSWEVMLRSCGFSNVALSPFALSQAKLLLRHLHYPSEG-YQLGVSSN-----SFFLGWQNQPLFSISSW
GARF I   480 SCPASES MERRETAASWARRMRSAGFSPVAFSEDVADDVRSLLRRY--REG-WSMREAGTDDSAAGAGVFLAWKEQPLVWASAW
SHR      359 ACEPSDS TERRETARKWSRRMRNSGFGAVGYSDEVADDVRSLLRRY--KEGVWSMVQCPD-----AAGIFLCWRDQPVVWASAW
GARF II  356 AQEGVER VERQEDRTRWGQRMRAAGFRAAAFGEAAAGEVKAMLDNH--AAG-WGMKREDDDD-----LVLTWKGHNVVVFASAW
                                                                 ***

```

Abbildung A1: Fortsetzung

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. Andreas Börner und Prof. Dr. Andreas Graner für die Überlassung des Themas bedanken.

Ganz herzlich danke ich Prof. Dr. Andreas Graner für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Eberhard Weber danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Marker der Abteilung Genbank am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben möchte ich für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima meinen Dank aussprechen. In diesem Zusammenhang möchte auch Frau Sonja Gentz und Frau Sylvane Stegmann für ihre exzellente Unterstützung im Labor danken.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Diederik Smilde, Dr. Markus Wolf, Dr. Dragan Perovic und Dr. Nils Stein für die konstruktiven Diskussionen und fachlichen Anregungen bedanken.

Danken möchte ich auch Dr. Raja Kota und Frau Ulrike Beyer für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der SNP-Analyse.

Dr. Andreas Börner und Frau Renate Voß (IPK, Arbeitsgruppe: Ressourcengenetik und Reproduktion) danke ich für ihre Hilfe und Anleitung bei der Kultivierung und GA₃-Testung der untersuchten Gerstenpflanzen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gottfried Künzel (IPK, Arbeitsgruppe: Getreidecytogenetik) für die durchgeführte Translokations-Kartierung und Prof. Dr. Takuji Sasaki (Genome Research Departement, Tsukuba, Japan) für die freundliche Bereitstellung von Reis-EST-Sonden.

Bei Frau Susanne König und Frau Bettina Brückner bedanke ich mich für die DNA-Sequenzierung.

Ich möchte allen Danken, die dazu beigetragen haben, daß mir die Zeit in Gatersleben unvergessen bleiben wird.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für ihre vielfältige Unterstützung, ihr Verständnis und ihr Interesse.

Diese Arbeit wurde vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, HSP III) finanziert.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Sven Gottwald
 Geburtsdatum und -ort: 29.12.1968 in Wesel
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

08.1975-06.1979 ev. Grundschule an der Böhlstraße in Wesel
 08.1979-05.1989 Konrad Duden Gymnasium in Wesel

Wehrersatzdienst:

08.1988-08.1994 Dienst als Helfer beim Katastrophenschutz in Wesel

Studium:

10.1989-08.1996 Studium der Agrarwissenschaften an der Justus-Liebig Universität Giessen (Fachrichtung Pflanzenproduktion mit den Schwerpunkten Pflanzenschutz, Angewandte Mikrobiologie und Organischer Landbau)
 Diplomarbeit: „Taxonomische Differenzierung der Gattung *Fusarium* mit Hilfe der digitalen Bildanalyse“
 Abschluß: Diplomagraringenieur

Praktikum:

04-10. 1993 Praktikum auf dem landwirtschaftlichen Betrieb Ulrich Engel (Holzheimer Hof) in 53415 Pohlheim

Berufliche Tätigkeit:

04.1997–10.1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Mikrobiologie in Giessen.
 Bestimmung, Isolierung und Kultivierung von Lebensmittelpilzen, sowie Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen gegen lebensmittelrelevante Schimmelpilze.
 Ausarbeitung eines DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft)-Forschungsantrags: „Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Lagerpilzen der Gattung *Eurotium* in Sojabohnen“.

10.1998-08.2003 Doktorarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben: „Genetische und physische Feinkartierung im Bereich des *gai* Verzweigungsgens auf dem Chromosom 2HS der Gerste (*H. vulgare* L.)“

Lehrerfahrungen:

1997–1998: Assistent, Mikrobiologisches Praktikum, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Giessen

Publikationen:

Gottwald S, Germeier Ch and Ruhman W (2001). Computerized image analysis in *Fusarium* taxonomy. Mycol Res 105 (2):206-214

Gottwald S, Börner A, Stein N and Graner A. The gibberellic-acid insensitive gene *gai* is genetically located on chromosome 2HS in a highly colinear region to rice chromosome 7L. MGG Molecular Genetics and Genomics (published online: 09.03.2004)

Poster:

Gottwald S, Germeier Ch and Ruhman W (1996). Computerized image analysis in *Fusarium* taxonomy. Poster- und Computerdemonstration, 50. Pflanzenschutztagung, Münster, Deutschland

Michalek W, Smilde WD, Pleissner K-P, Gottwald S, Drescher A and Graner A (2000). The barley EST collection: Generation, Characterization, Utilization. Posterdemonstration, 5th Gatersleben Research Conference, Meisdorf, Deutschland

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit von mir selbständig angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt.

Mit dieser Arbeit wurden noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen.

Weiter erkläre ich, daß keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Sven Gottwald

Gatersleben, im Oktober 2003